

2004

REC'D 08 JUN 2004

WIPO

PCT

PCT/KR 2004/001246

0/519396  
KO/KR 27.05.2004



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

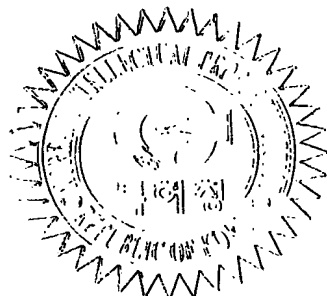
This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0051846  
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 07월 26일  
Date of Application JUL 26, 2003

출원 인 : 메덱스젠 주식회사  
Applicant(s) MEDEXGEN INCORPORATED

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



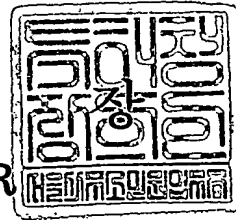
2004 년 05 월 04 일

특

허

청

COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.07.26
【발명의 명칭】	생리활성 조절 단백질의 효능 향상 방법 및 그 예시 변이체들
【발명의 영문명칭】	A method of improving efficacy of biological response-modifying proteins and the example muteins
【출원인】	
【명칭】	메덱스젠 주식회사
【출원인코드】	1-2001-030707-8
【대리인】	
【성명】	이세진
【대리인코드】	9-2000-000320-8
【포괄위임등록번호】	2002-056122-5
【대리인】	
【성명】	김성남
【대리인코드】	9-1998-000150-9
【포괄위임등록번호】	2002-056123-2
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정용훈
【성명의 영문표기】	CHUNG, Yong Hoon
【주민등록번호】	570720-1009328
【우편번호】	138-170
【주소】	서울특별시 송파구 송파동 삼익아파트 212동 1201호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	전재원
【성명의 영문표기】	JEON, Jae Won
【주민등록번호】	740926-1526410
【우편번호】	143-130
【주소】	서울특별시 광진구 화양동 19-38
【국적】	KR

## 【발명자】

【성명의 국문표기】 진화섭  
 【성명의 영문표기】 CHIN, Hwa Sup  
 【주민등록번호】 770603-1011913  
 【우편번호】 139-051  
 【주소】 서울특별시 노원구 월계1동 동신아파트 7동 1007호  
 【국적】 KR

## 【미생물기탁】

【기탁기관명】 KCCM  
 【수탁번호】 KCCM-10500  
 【수탁일자】 2003.06.09

## 【미생물기탁】

【기탁기관명】 KCCM  
 【수탁번호】 KCCM-10501  
 【수탁일자】 2003.06.09

## 【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 42  
 【서열목록의 전자파일】 첨부

## 【취지】

특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인  
 이세진 (인) 대리인  
 김성남 (인)

## 【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원  
 【가산출원료】 99 면 99,000 원  
 【우선권주장료】 0 건 0 원  
 【심사청구료】 0 항 0 원  
 【합계】 128,000 원  
 【감면사유】 소기업 (70%감면)  
 【감면후 수수료】 38,400 원

## 【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)\_1통

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체, 이 변이체를 코딩하는 DNA, 이 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터, 이 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포, 이 숙주세포를 배양하고 이의 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리하는 단계를 포함한 단백질 변이체의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 단백질 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

**【대표도】**

도 1a

**【색인어】**

생리활성 조절작용, 결합 도메인, 페닐알라닌, 발린, 단백질 변이체

## 【명세서】

## 【발명의 명칭】

생리활성 조절 단백질의 효능 향상 방법 및 그 예시 변이체들{A method of improving efficacy of biological response-modifying proteins and the example muteins}

## 【도면의 간단한 설명】

도 1a는 4-나선 다발 초가계 소속 사이토카인에서 해당 수용체와의 결합에 관여하는 도메인내 아미노산 서열을 비교 나열한 것이고, 도 1b는 인터페론에서 해당 수용체와의 결합에 관여하는 도메인내 아미노산 서열을 비교한 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 사이토카인 변이체를 코딩하는 DNA를 위치 지정 돌연변이(site-directed mutagenesis)를 이용해서 제조하는 과정을 나타낸 개략도이다.

도 3a는 본 발명에 따라 제조된 TPO 변이체의 에스디에스-페이지(SDS-PAGE) 결과(왼쪽 레인부터 마커; 야생형 TPO; TPO-[F46V]; TPO-[F128V]; TPO-[F131V]; TPO-[F141V])를 나타낸 것이고, 도 3b는 본 발명에 따라 제조된 EPO 변이체의 에스디에스-페이지(SDS-PAGE) 결과(왼쪽 레인부터 마커; 야생형 EPO; EPO-[F48V]; EPO-[F138V]; EPO-[F142V]; EPO-[F148V])를 나타낸 것이다.

도 4a는 야생형 TPO 및 본 발명에 따른 TPO 변이체의 TPO 수용체에 대한 결합 친화력을 ELISA assay로 측정한 결과를 나타낸 것이고, 도 4b는 야생형 EPO 및 본 발명에 따른 EPO 변이체의 EPO 수용체에 대한 결합 친화력을 ELISA assay로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 5a는 야생형 TPO 및 본 발명에 따른 TPO 변이체의 TPO 수용체에 대한 결합 친화력을 SPR 기법으로 측정한 결과를 나타낸 것이고, 도 5b는 사람의 야생형 EPO 및 본 발명에 따른 EPO 변이체의 EPO 수용체에 대한 결합 친화력을 SPR 기법으로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6a는 야생형 TPO 및 본 발명에 따른 TPO 변이체의 TPO 수용체에 대한 결합 친화력을 세포 유동분석법으로 비교한 결과를 나타낸 것이고, 도 6b는 야생형 EPO 및 본 발명에 따른 EPO 변이체의 EPO 수용체에 대한 결합 친화력을 세포유동분석법으로 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 7a는 야생형 TPO 및 본 발명에 따른 TPO 변이체의 농도에 따른 TF-1/*c-Mpl* 세포의 증식 정도를 나타낸 그래프이고, 도 7b는 야생형 EPO 및 본 발명에 따른 EPO 변이체의 농도에 따른 TF-1 세포 증식정도를 나타낸 그래프이다.

도 8a, 8b 및 8c는 각각 본 발명에 따른 TPO 변이체의 농도에 따른 랫트의 체내(*in vivo*)에서 혈소판, 백혈구, 중성구 세포의 증식정도를 나타낸 그래프이다.

#### 【발명의 상세한 설명】

#### 【발명의 목적】

#### 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <9> 본 발명은 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 사람 사이토카인 단백질에서 해당 수용체와 결합하는 알파 나선 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체에 관한 것이다.
- 10> 사람의 질병 중 상당수는 단백질의 결합에 의한 기능 상실 또는 단백질 양의 부족 등으로 인하여 유발되고 있다. 이러한 질병을 치료하기 위해서 사람에게 직접 단백질을 투여하는 방식이 이용되고 있다. 그러나, 이처럼 의약품으로 사용되고 있는 많은 생리활성 단백질들은 대부분 목적인 조직에 도달하여 작용하기 전에 혈청내에서 쉽게 분해되기 때문에 이들 물질을 사용

하는 환자들은 생리활성 단백질이 체내에서 작용을 할 수 있는 일정 수준의 농도를 유지하기 위해 과량 및 잦은 투여를 받아야 하는 등의 문제점이 있었다.

- 1> 상기 문제점을 해결하기 위한 하나의 접근 방식은 생리활성 조절 단백질을 폴리에틸렌글리콜과 접합시키거나 마이크로캡슐화하는 것이다. 그러나 이들 방법은 1차로 단백질을 미생물로부터 생산 및 정제한 후, 부가반응을 수행하여야 하는 번거로움을 수반하게 된다. 또한 원하지 않는 위치에서 교차연결(cross-linking)이 일어날 수 있으며 최종 생산물의 동질성(homogeneity)에 문제점이 있을 수 있다.
- 12> 다른 접근 방법은 당쇄화를 이용하는 것이다. 세포 표면 단백질 및 진행 세포에 의해 생산되는 분비 단백질들은 당쇄화에 의해서 수식(modification)된다. 당쇄화는 단백질의 물리적 성질은 물론, 단백질의 생체 내에서의 안정성 및 기능에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 그러나, 당쇄화된 단백질은 당쇄화를 수행할 수 있는 진행세포를 통해서 제조할 수 있으므로 제조방법이 까다로우며, 목적인 위치에 모두 당쇄화가 이루어진 동질의 최종 생산물을 수득하기 어렵다.
- 13> 아울러, 이러한 종래기술들은 모두 투여 회수로 인한 제반 문제를 개선하는데는 도움이 되었으나 단백질의 생리활성 효능(efficacy)을 높이는 문제는 개선하지 못함으로써 과량투여의 문제를 남기고 있다. 예를 들면, Amgen사로부터 개발된 NESP(미국특허공보 제 6,586,398호)의 경우 혈중 반감기의 개선으로 잦은 투여의 문제는 다소 해결되었으나 효능을 증대시키는데 실패함으로써 여전히 1회 투여량이 과다하여 발생하는 차단항체 생성의 문제는 여전히 남아있는 상태이다.
- 14> 생리활성 단백질의 효능을 향상시키기 위한 접근 방식으로서 야생형 단백질의 일부 아미노산을 돌연변이시켜서 생물학적 활성을 개선시키는 방법이 있다. 이러한 변이체와 관련하여 하기

의 특허문헌들이 개시되어 있다: (1) 미국특허공보 제 5,457,089호-에리스로포이에틴과 이의 수용체 간의 결합력을 증진시키기 위해서 에리스로포이에틴의 카르복시 말단을 돌연변이시킨 에리스로포이에틴 변이체; (2) 국제특허공보 제 02/077034호-사람에게 투여되었을 때 면역반응을 줄이기 위해서 T-세포 에피토프를 돌연변이시킨 과립구 형성인자 변이체; (3) 국제특허공보 제 99/57147호-사람의 성숙한 TP0 단백질의 최소한 7번째 아미노산부터 151번째 아미노산을 포함하는 TP0 단백질에 있어서, 115번째 아미노산인 글루탐산을 리신, 아르기닌 또는 티로신으로 치환한 트롬보포이에틴 변이체; 및 (4) 미국특허공보 제 6,136,563호 및 6,022,711호-18, 22, 25, 26, 29, 65, 168 및 174번째 아미노산의 알라닌으로 치환으로 효능이 증가된 사람 성장 호르몬 변이체.

- 15> 그러나, 전술한 단백질 변이체는 생체 내에서의 항원성 변화는 고려하지 않고 단지 효능 개선만을 위해서 만들어진 변이된(altered) 형태이다. 따라서 그 변이의 규모, 정도 및 위치가 사람내에서 항원성을 유발할 가능성이 매우 높다. 일단 사람내에서 항원성을 일으키면 심각한 부작용을 초래하게 된다(Casadevall et al. N. Eng. J. Med. 2002, 346:469).

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- 16> 따라서, 본 발명의 목적은 기존의 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 효능을 개량하여 투여시 생리활성 조절작용의 효과는 극대화하고 차단항체의 생성도 방지할 수 있는 개선된 약리작용을 가지는 생리활성 조절작용 단백질 변이체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.
- 17> 한 관점으로서, 본 발명은 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체를 제공한다.



- ▷ 다른 관점으로서, 본 발명은 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체를 코딩하는 DNA를 제공한다.
- ▷ 또 다른 관점으로서, 본 발명은 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- 0> 또 다른 관점으로서, 본 발명은 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 제공한다.
- 11> 또 다른 관점으로서, 본 발명은 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리하는 단계를 포함한 단백질 변이체를 제조하는 방법을 제공한다.
- 22> 또 다른 관점으로서, 본 발명은 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

## 【발명의 구성 및 작용】

- 33> 본 발명의 명세서에서 사용된 아미노산 일문자는 생화학 분야에서의 표준 약어 규정에 따라 다음의 아미노산을 의미한다:
- 34> A: 알라닌; B: 아스파라긴 또는 아스파르트산; C: 시스테인;
- 35> D: 아스파르트산; E: 글루탐산; F: 페닐알라닌;
- 36> G: 글라이신; H: 히스티딘; I: 이소류신; K: 리신; L: 류신;
- 37> M: 메티오닌; N: 아스파라긴; P: 프롤린; Q: 글루타민;
- 38> R: 아르기닌; S: 세린; T: 쓰레오닌; V: 발린;
- 39> W: 트립토판; Y: 티로신; Z: 글루타민 또는 글루탐산.
- 30> 본 발명의 명세서에 표기되는 "(아미노산일문자)(아미노산위치)(아미노산일문자)"는 주어진 단백질의 해당 아미노산 위치에서 선행 표기된 아미노산이 후행 표기된 아미노산으로 치환된다는 것으로 의미한다. 예를 들면, F48V는 주어진 단백질의 아미노산 잔기 48번에 해당하는 페닐알라닌이 발린으로 치환된다는 것을 가리킨다. 상기 아미노산 위치는 성숙한(mature) 야생형(wild type) 단백질의 N-말단에서부터 번호를 매긴(numbered) 것이다.
- 31> 본 발명의 명세서에서 사용된 용어 "단백질 변이체"는 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질에 있어서, 상기 수용체, 리간드 또는 기질과의 결합에 관여하는 도메인에 있는 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환하여, 야생형 단백질의 아미노산 서열과는 다른 아미노산 서열을 가지는 단백질을 말한다. 본 발명에서 단백질 변이체는 편의상 "단백질 명칭-[(아미노산일문자)(아미노산위치)(아미노산일문자)]"로 표기할 수 있다.

예를 들면, 야생형 TPO의 131번째 아미노산인 페닐알라닌이 발린으로 치환된 TPO 변이체는 TPO-[F131V]로 표기된다.

- 2> 본 발명의 명세서에서 "생리활성 조절작용"이란, 다세포로 이루어진 생체내에서 일어나는 여러 가지 생물학적 활성들이 일어나도록 유도하거나, 이들이 유기적으로 연관되도록 조절하거나, 생체가 항상성을 유지하도록 조절하는 것을 말한다.
- 3> 본 발명의 명세서에서 "결합 도메인(또는 결합에 관여하는 도메인)"이란, 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하는 기능을 수행하는 단백질의 일부분(즉, 도메인)을 의미하며, 이러한 도메인은 당업계에서 널리 공지되어 있다. 예를 들면, 본 발명의 일실시예에 해당하는 4-나선 다발 소속 사이토카인의 경우는 D-알파 나선구조가, 인터페론의 경우는 A-알파 나선구조가 해당 수용체와 결합하는 도메인으로 알려져 있다.
- 34> 본 발명은 수용체, 리간드 또는 기질에 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질을 대상으로, 상기 생리활성 조절작용의 효능을 증가시키기 위해서 수용체, 리간드 또는 기질에 대하여 야생형 보다 증가된 소수성 인력(hydrophobic force)으로 결합할 수 있는 단백질 변이체를 제공하고자 하며, 이를 위해서 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환하는 것을 특징으로 한다.
- 35> 페닐알라닌은 방향족의 곁사슬을 가진 상대적으로 비극성인 아미노산으로, 공지된 소수성 지표는 3.0인데 반하여, 발린은 비극성이고 소수성인 지방족 곁사슬을 가진 아미노산으로, 공지된 소수성 지표는 4.0이다. 또한 발린의 크기는 페닐알라닌 보다 작기 때문에 발린으로 치환된 단백질은 해당 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하는 포켓(pocket)이 깊어지게 된다.

따라서, 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질은 소수성 인력이 증가되고 공간적 깊이가 더해짐에 따라 수용체, 리간드 또는 기질과의 결합 친화력은 증가하게 되어, 목적인 생리활성 조절작용의 효능을 증가시킬 수 있을 것이다.

- 6> 아울러, 페닐알라닌을 발린으로 치환하는 것은 보존적 치환으로서, 이러한 치환은 단백질의 2차 또는 3차 구조에 최소한의 영향을 미치기 때문에 단백질의 기능 자체에는 거의 영향을 미치지 않는다(Argos, EMBO J. 1989, Vol.8, p779-85). 더 나아가, 특히 소수성이 높은 영역에 존재하는 페닐알라닌은 단백질 표면으로의 노출정도가 약할 뿐만 아니라 이 아미노산을 발린으로 치환하면 해당 아미노산은 단백질의 표면으로부터 더욱 함몰되게 되어 이러한 치환으로 인한 항체유발 가능성은 더욱 낮아지게 된다. 따라서, 어떠한 단백질이 특유의 생리활성 조절작용을 나타내기 위해서는 먼저 수용체, 리간드 또는 기질과 결합해야만 하며, 이 결합이 강할수록 상기 생리활성 조절작용의 효능(efficacy)을 증가시킬 수 있는 경우에, 이와 관련된 단백질들은 모두 본 발명에 따라 변이될 수 있으며, 본 발명은 이러한 단백질 변이체를 모두 포함한다.

- 37> 이러한 페닐알라닌을 발린으로 치환함으로써 결합 친화력이 증대되는 사실은 실제로 사람 자면역결핍에서 NK 세포에서 발현되는 Fc $\gamma$ RIIIa(CD16) 단백질에서 돌연변이의 발견으로 더욱 뒷받침되고 있다. 즉, 사람의 이 수용체 단백질의 아미노산중에서 이 단백질 수용체의 리간드인 항체의 Fc를 인식결합 부위에 존재하는 176번째 아미노산이 페닐알라닌인 사람과 발린인 사람으로 나누어지는데(polymorphism), 이중 페닐알라닌인 사람은 리간드인 항체 Fc부위와 결합력이 약화되어 그 기능을 제대로 못함으로써 SLE(systemic lupus erythematosus)라는 질병에 걸릴 확률이 매우 높아지게 된다는 사실이다(Jianming Wu et al. J. Clin. Invest. 1997, Vol.100, p1059-70).

18> 본 발명에 따라 변이될 수 있는 단백질은 앞서 주지된 바와 같이 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 특유의 생리활성 조절작용을 나타낼 수 있는 단백질을 모두 포함한다. 예를 들면, 이에 한정되는 것은 아니지만, 사이토카인, 사이토카인 수용체, 접착 분자(adhesion molecules), 종양 괴사 인자(TNF) 수용체, 효소, 수용체 티로신 키나제, 케모카인 수용체, 기타 세포 표면 단백질, 가용성 리간드 등이 포함된다. 사이토카인은 이들로 한정되는 것은 아니지만 CNTF(cytoneurotrophic factor), GRH(growth hormone), IL-1, IL-1Ra(interleukin-1 receptor antagonist), placental lactogen(PL), cardiolipin, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-17, TNF(tumor necrosis factor), TGF(transforming growth factor), IFN(interferon), GM-CSF(granulocyte-monocyte colony stimulating factor), G-CSF(granulocyte colony stimulating factor), EPO(erythropoietin), TPO(thrombopoietin), M-CSF(monocyte colony stimulating factor), LIF(leukemia inhibitory factor), OSM(oncostatin-M), SCF(stem cell factor), HGF(hepatocyte growth factor), FGF(fibroblast growth factor), 및 IGF(insulin-like growth factor) 등을 포함한다. 사이토카인 수용체는 이들로 한정되는 것은 아니지만 성장호르몬 수용체(GHR), IL-13R, IL-1R, IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, IL-9R, IL-15R, TNFR, TGFR, IFNR(예, IFN- $\gamma$  R  $\alpha$ -쇄, IFN- $\gamma$  R  $\beta$ -쇄), 인터페론- $\alpha$  R,  $-\beta$  R 및  $-\gamma$  R, GM-CSFR, G-CSFR, EPOR, cMpl, gp130, Fas(Apo 1) 등을 포함한다. 케모카인 수용체의 예로는 CCR1, CXCR1-4를 들 수 있다. 수용체 티로신 키나제의 예로는 TrkA, TrkB, TrkC, Hrk, REK7, Rse/Tyro-3, 간세포 성장 인자 R, 혈소판-유래된 성장 인자 R, Flt-1이 포함된다. 다른 세포 표면 단백질의 예로는 CD2, CD4, CD5, CD6, CD22, CD27, CD28, CD30, CD31, CD40, CD44, CD100, CD137, CD150, LAG-3, B7, B61,  $\beta$ -뉴렉신,

CTLA-4, ICOS, ICAM-1, 보체 R-2(CD21), IgER, 리소좀막 gp-1,  $\alpha$ 2-마크로글로불린 수용체-연관된 단백질, 나트륨배설 펩타이드 R을 들 수 있다.

9> 본 발명의 한 양태는 사이토카인에 관한 것으로, 사이토카인은 일반적으로 수개의 알파 나선을 포함하고 있으며, 이들 중 N-말단에서부터 첫번째와 마지막 나선이 해당 사이토카인 수용체와의 결합 도메인으로 알려져 있다(도 1참조). 각 사이토카인마다 해당 수용체와 결합하는 알파 나선은 다르지만, 또한, 당업계에서 잘 알려져 있다. 예를 들어 IL-2의 경우 두번째와 다섯번째 나선은 IL-2의 수용체중 p55알파 수용체와 결합하는 나선이고, 첫번째 나선은 IL-2의 수용체중 p75감마 수용체와 결합하며, 여섯번째 나선은 감마 수용체와 결합하게 된다(Fernando Bazan, Science J. 1992, Vol.257, p410-2). 이처럼 사이토카인마다 특유의 결합에 관여하는 나선이 존재하지만 이들의 아미노산 서열을 비교해보면 매우 보존적인 서열이 존재한다. 본 발명은 사이토카인의 결합 도메인에 해당하는 알파 나선에 있는 페닐알라닌을 발린으로 치환시켜서, 사이토카인 수용체에 대하여 야생형 사이토카인보다 높은 결합 친화력으로 결합할 수 있는 사이토카인 변이체를 제공한다.

40> 상기 사이토카인과 관련된 한 양태는 인터페론에 관한 것이다. 인터페론은 아미노산 서열 10-44번째에 해당하는 첫번째 나선(A-알파 나선)이 해당 수용체와 결합하는데 관여하는 도메인으로 알려져 있다. 따라서, 본 발명은 인터페론의 상기 A-알파 나선에 있는 페닐알라닌을 발린으로 치환시켜서, 인터페론 수용체에 대하여 야생형 인터페론보다 높은 결합 친화력으로 결합할 수 있는 인터페론 변이체를 제공한다.

41> 상기 사이토카인과 관련된 다른 양태는 4-나선 다발 초가계 소속 사이토카인에 관한 것이다. 이들은 모두 4개의 알파 나선을 포함하는 특징을 가지고 있으며, 여기서 4개의 알파 나선은 N-말단에서부터 A-알파 나선, B-알파 나선, C-알파 나선, D-알파 나선으로 명명되어있고, 주로

D- 및 A-알파 나선이 수용체와 결합하는데 관여하는 도메인으로 알려져 있다.(Fernando Bazan, Immunology today, 1990, Vol.11 p350-4, The Cytokine Facts Book, 1994, p104-247). 4-나선 다발 초가계 소속 사이토카인의 D-알파 나선은 대략 20개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 사이토카인의 아미노산 서열간의 유사성은 낮으나, 하나 이상의 페닐알라닌을 가지고 있다. 따라서, 본 발명은 4-나선 다발 초가계 소속 사이토카인의 D-알파 나선에 있는 페닐알라닌을 발린으로 치환시켜서, 해당 수용체에 대하여 야생형 4-나선 다발 초가계 소속 사이토카인 보다 높은 결합 친화력으로 결합할 수 있는 4-나선 다발 초가계 사이토카인 변이체를 제공한다.

> 한편, 본 발명에 따라 변이되는 부분인 결합 도메인에는 둘 이상의 페닐알라닌이 포함되어 있을 수 있으며, 둘 이상의 페닐알라닌을 발린으로 치환할 수도 있지만, 이러한 경우에 단백질의 발현율이 급격히 떨어지게 때문에 하나의 페닐알라닌만을 발린으로 치환하는 것이 바람직하다. 아울러, 본 발명자들은 4-나선 다발 초가계 소속 사이토카인 D-알파 나선의 중심(도 1a 및 b에서 0) 가까이에 위치한 페닐알라닌일수록 발린으로 치환되었을 때 수용체와의 친화력이 증가되어 생물학적 조절작용 효능이 더 크게 증가하는 것을 확인하였다. 따라서, 수용체와의 결합에 관여하는 알파 나선의 중심에 가까운(도1a에서 +1 위치, 도 1b에서 -1위치에 해당하는) 페닐알라닌을 발린으로 치환하는 것이 가장 바람직하다. 본 발명에서 알파 나선의 중심은 본 발명자들에 의해서 이용된 아미노산 서열 배열 프로그램에 의해서 결정된 것이므로 또다른 아미노산 배열 프로그램을 이용할 경우에는 상기 알파 나선의 중심은 달라질 수 있다. 따라서, 본 발명의 명세서에서 알파 나선의 중심은 도면 1에 나타낸 것을 의미한다.

43> 본 발명에 따른 단백질 변이체는 생화학 분야의 당업자에게 일반적으로 널리 알려져 있는 화학적 합성법에 의해 제조될 수 있다(Creighton, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman and Co., NY (1983)). 대표적인 방법으로서 이들로 한정되는 것은

아니지만 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법이 포함된다(Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, Williams et al., Eds., CRC Press, Boca Raton Florida, (1997); A Practical Approach, Atherton & Sheppard, Eds., IRL Press, Oxford, England, (1989)).

- > 다른 방도로서, 본 발명에 따른 단백질 변이체는 유전공학적 방법에 의해 제조할 수 있다. 이와 같은 방법은, 본 발명의 단백질 변이체를 코딩하는 DNA 서열을 작제하는 것을 포함한다. 이러한 DNA 서열은 야생형 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 변이시켜서 제조할 수 있다. 이를 간단하게 설명하면, 야생형 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 합성한 후, 위치 지정 돌연변이 (site-directed mutagenesis)에 의해서 페닐알라닌에 대한 코돈을 발린에 대한 코돈으로 변화 시킴으로써, 원하는 DNA 서열을 작제한다.
- 5> 본 발명에 따른 단백질 변이체를 코딩하는 DNA 서열을 작제하는 다른 방법은 화학 합성법일 것이다. 예를 들면, 단백질 변이체를 코딩하는 DNA 서열은 올리고뉴클레오타이드 합성기를 사용하는 화학적 방법에 의해서 합성할 수 있다. 이와 같은 올리고뉴클레오타이드는 목적하는 단백질 변이체의 아미노산 서열을 기초로 하여, 그리고 바람직하게는 재조합 단백질 변이체가 생산 되는 숙주세포에서 바람직한 코돈을 선택함으로써 만들어진 것이다. 이와 관련해서, 유전자 코드의 축퇴됨(degenerate), 즉, 아미노산이 1개 이상의 코돈에 의해서 코딩될 수 있음은 익히 알려져 있다. 따라서, 특정 단백질 변이체를 코딩하는 다수의 축퇴성 DNA 서열이 존재할 것이며, 이들은 모두 본 발명의 범위에 속하는 것으로 간주된다.
- 46> 본 발명에 따른 단백질 변이체를 코딩하는 DNA 서열은 신호 서열을 코딩하는 DNA 서열을 포함 하거나 포함하지 않을 수 있다. 이와 같은 신호 서열은, 존재하는 경우, 단백질 변이체의 발 현을 위해서 선택된 숙주세포가 인식할 수 있는 것이어야만 한다. 이는 또한 원핵세포 또는



진핵세포, 또는 이들의 조합일 수 있다. 이는 또한 천연 단백질의 신호 서열일 수 있다. 신호 서열의 포함 여부는, 단백질 변이체를 생산하는 재조합 세포로부터 단백질 변이체를 분비시키는 것이 바람직한지에 따라 결정될 수 있다. 선택된 세포가 원핵세포인 경우, 일반적으로 DNA 서열이 신호 서열을 코딩하는 것이 아니라 직접 발현을 위해 N-말단 메티오닌을 포함하는 것이 바람직하다. 선택된 세포가 진핵세포인 경우, 일반적으로 신호 서열이 코딩되는 것이 바람직하고, 야생형 단백질 서열이 사용되는 것이 가장 바람직하다.

- 7> 이렇게 제조된 DNA 서열은 이 DNA 서열에 작동가능하게 연결되어(operatively linked) 그 DNA 서열의 발현을 조절하는 하나 또는 그 이상의 발현 조절 서열(expression control sequence)을 포함하는 벡터에 삽입시키고, 이로부터 형성된 재조합 발현 벡터로 숙주를 형질전환 또는 형질감염시키며, 생성된 형질전환체 또는 형질감염체를 상기 DNA 서열이 발현되도록 적절한 배지 및 조건하에서 배양하고, 배양물로부터 상기 DNA 서열에 코딩된 실질적으로 순수한 폴리펩타이드를 회수한다.
- 48> 본원 명세서에 사용된 용어 “벡터”는 외래 유전자를 숙주세포 내로 안정적으로 운반할 수 있는 운반체로서의 DNA 분자를 말한다. 유용한 벡터가 되기 위해서는 복제될 수 있어야 하며, 숙주세포 내로 유입될 수 있어야 하고, 자신의 존재를 검출할 수 있는 수단을 구비하여야 한다. 또한 “재조합 발현 벡터”라는 용어는 일반적으로 외래 유전자가 숙주세포에서 발현될 수 있도록 벡터에 작동가능하게 연결되어 형성된 환상의 DNA 분자를 말한다. 재조합 발현 벡터는 수 개의 카피 및 그의 삽입된 이종의 DNA가 생성될 수 있다. 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염된 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절 서열 및 해당 유전자를 세균 선택 마커 및 복제 개시점

(replication)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다. 발현 숙주가 진핵 세포인 경우에는 발현 벡터는 진핵 발현 숙주세포 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

- > 상기 재조합 발현 벡터와 연관되어서 사용된 용어 “조절 서열 (expression control sequence)” 은 본 발명의 폴리펩타이드 발현에 필수적인 혹은 이로운 핵산 서열들을 말한다. 각각의 조절 서열은 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열에 천연적(native) 혹은 외래적(foreign)일 수 있다. 그러한 조절 서열에는 이에 제한되는 것은 아니지만, 리더 서열, 폴리 아데닐화 서열, 프로펩타이드(propeptide) 서열, 프로모터, 인핸서(enhancer) 혹은 업스트림(upstream) 활성화 서열, 시그날 펩타이드 서열 및 전사 종결인자 등을 포함한다. 최소한 조절 서열은 프로모터를 포함한다.
- 0> 또 다른 용어 “작동가능하게 연결된(operably linked)” 은 핵산이 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치된 상태를 의미한다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더(leader)가 성숙한 단백질의 분비에 참여함으로써 기능을 발휘했다면 그 단백질에 작동가능하게 연결된 것이다. 프로모터가 코딩 서열의 전사를 조절했다면 그 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 리보솜 결합 자리가 코딩 서열의 해독이 가능한 위치에 놓여져 있다면 그 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 일반적으로, “작동가능하게 연결된” 은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 적합한 제한 효소

부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고 뉴클레오타이드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

> 본 발명에 따른 폴리펩타이드의 DNA 서열을 발현시키기 위해 매우 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵 숙주에 적합한 발현 벡터로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus), 시토메갈로바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열이 포함된다. 세균 숙주에 사용할 수 있는 발현 벡터에는 pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, pUC벡터, col E1, 중합효소 연쇄반응1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체와 같이 이. 콜라이에서 얻는 것을 예시할 수 있는 세균성 플라스미드, RP4와 같이 보다 넓은 숙주 범위를 갖는 플라스미드,  $\lambda$ gt10과  $\lambda$ gt11, NM989와 같은 매우 다양한 파지 람다(phage lambda) 유도체로 예시될 수 있는 파지 DNA, 및 M13과 필라멘트성 단일가닥의 DNA 파지와 같은 기타 다른 DNA 파지가 포함된다. 효모 세포에 유용한 발현 벡터는 2 $\mu$  플라스미드 및 그의 유도체이다. 곤충 세포에 유용한 벡터는 pVL 941이다.

32> 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열중 어느 것이라도 이들 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절 서열에는 상술한 발현 벡터의 구조 유전자와 연관된 발현 조절 서열을 포함한다. 유용한 발현 조절서열의 예에는, 예를 들어, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 람다의

주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기 포스파타제의 프로모터들, 예를 들어 Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 구성과 유도의 기타 다른 서열, 및 이들의 여러 조합이 포함된다. T7 RNA 폴리메라아제 프로모터  $\Phi 10$ 은 이. 콜라이에서 폴리펩타이드를 발현시키는 데 특히 유용하다.

3> 상술한 재조합 발현 벡터에 의해 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본 발명의 DNA 서열을 발현시키는 데에는 매우 다양한 단핵세포성 숙주 세포가 이용될 수 있다. 이들 숙주에는 이. 콜라이, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 진균, 효모와 같은 주지의 진핵 및 원핵 숙주들, 스포도프테라 프루기페르다(SF9)와 같은 곤충 세포, CHO 및 마우스 세포와 같은 동물 세포, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40 및 BMT 10과 같은 아프리카 그린 원숭이 세포, 및 조직배양된 인간 세포 및 식물 세포들이 포함된다. 바람직한 숙주 생명체에는 이. 콜라이 및 바실러스 서브틸리스와 같은 세균, 그리고 조직배양된 포유동물 세포들이 포함된다.

54> 전술한 형질전환 및 형질감염은 Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology(1986) 및 Sambrook et al., Basic Methods in Molecular Biology와 같은 기본적인 실험 지침서에 기술된 방법에 의해서 실시될 수 있다. 본 발명에 따른 단백질 변이체를 코딩하는 DNA 작제물을 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포로 도입하는데 바람직한 방법은 예를 들어서, 칼슘 포스페이트 형질전환(calcium

phosphate transfection), DEAE-덱스트란 매개 형질전환(DAEA-dextran mediated transfection), 이환(transvection), 미세주입(microinjection), 양이온 지질-매개 형질전환(cationic lipid-mediated transfection), 전기천공(electroporation), 형질도입(transduction), 스크래프 로딩(scrape loading), 총알식 도입(ballistic introduction) 혹은 감염(infection) 등을 포함한다.

> 물론 모든 벡터와 발현 조절 서열이 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담 없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 암호화된 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다. 발현 조절 서열을 선정함에 있어서도, 여러 가지 인자들을 고려하여야만 한다. 예를 들어, 서열의 상대적 강도, 조절가능성 및 본 발명의 DNA 서열과의 상용성 등, 특히 가능성 있는 이차 구조와 관련하여 고려하여야 한다. 또한 숙주를 선정함에 있어서도, 선택된 벡터와의 상용성, 뉴클레오타이드 서열에 의해서 암호화된 산물의 독성, 이들의 분비 특성, 폴리펩타이드를 올바르게 폴딩(fold)할 수 있는 능력, 발효 또는 배양 필요조건, 그리고 뉴클레오타이드 서열에 의해서 암호화된 산물의 정제 용이성 등을 고려하여야 한다.

56> 본 발명에 따른 단백질 변이체의 제조 방법에서, 숙주세포들은 공지된 기술을 이용해서 폴리펩타이드의 생산에 적합한 영양 배지에서 배양된다. 예를 들어서, 세포들은 적당한 배지와 폴리펩타이드가 발현 및/혹은 분리되는 것을 허용하는 조건 하에, 실시된 실험실 또는 산업용 발

효기에서 소규모 혹은 대규모 발효, 셰이크 플라스크 배양에 의해서 배양될 수 있다. 배양은 공지된 기술을 사용해서, 탄소, 질소 공급원 및 무기염을 포함하는 적절한 영양배지에서 일어난다. 적당한 배지는 상업적인 공급자로부터 입수 가능하고 공지된 조성(예를 들면, American Type Culture Collection의 카탈로그)에 따라 제조될 수 있다. 폴리펩타이드가 영양배지로 직접 분비된다면 폴리펩타이드는 배지로부터 직접 분리될 수 있다. 폴리펩타이드가 분비되지 않는다면, 그것은 세포의 여액(lysate)으로부터 분리될 수 있다.

- 38> 폴리펩타이드는 당업계에 공지된 방법에 의해서 분리될 수 있다. 예를 들어서, 폴리펩타이드는 이로서 제한되는 것은 아니지만, 원심분리, 여과, 추출, 분무 건조, 증발, 또는 침전을 포함하는 전통적인 방법에 의해서 영양 배지로부터 분리될 수 있다. 더 나아가 폴리펩타이드는 크로마토그래피(예를 들면, 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기별 배제), 전기영동, 분별용해도(예를 들면, 암모늄 설페이트 침전), SDS-PAGE 혹은 추출을 포함하여 일반에 공지된 다양한 방법을 통해서 정제될 수 있다.
- 38> 본 발명은 상기 단백질 변이체를 약제학적 유효량으로 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 함유하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- 39> 본 발명의 약제학적 조성물에 사용되는 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 보조제 및 비히클을 포함하며 총괄적으로 “약제학적으로 허용되는 담체” 라고 한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 약제학적으로 허용되는 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 이온 교환, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 여러 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피

롤리돈, 셀룰로즈-계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-차단 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지 등이 포함된다.

- ▷ 본 발명의 약제학적 조성물은 목적하는 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 약제학적 조성물은 국부, 경구, 비경구, 안내, 경피, 직장, 장관 등으로 투여될 수 있고, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다. 본원에 사용된 용어 “비경구”는 피하, 비내, 정맥내, 복강내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 심장내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.
- 1> 한 양태로서, 본 발명의 약제학적 조성물은 비경구적 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있다. 바람직하게는, 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 적절한 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 덱스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다. 덧붙여서, 활성성분의 현탁액은 적합한 유질의 주입 현탁액(oily injection suspension)으로 적합한 친지성 용매 또는 담체는 참기름과 같은 지방산 또는 에틸 올레이트, 트리글리세라이드 또는 리포솜과 같은 합성 지방산 에스테르를 포함한다. 복수 양이온성 비지질 아미노 폴리머(polycationic amino polymers)도 운반체로서 사용될 수 있다. 임의로, 현탁액은 화합물의 용해도를 증가시키고 고농도의 용액을 제조하기 위해 적합한 안정화제 또는 약제를 사용할 수 있다.
- 32> 본 발명의 바람직한 약제학적 조성물은 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액으로서 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예, 트윈 80) 및 현

탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형될 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액(예, 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해, 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 어떠한 비휘발성 오일도 사용할 수 있다. 올레산 및 이의 글리세라이드 유도체와 같은 지방산이 약제학적으로 허용되는 천연 오일(예, 올리브유 또는 피마자유), 특히 이들의 폴리옥시에틸화된 것과 마찬가지로 주사 제제에 유용하다.

3> 앞서 제조된 액상 조성물은 박테리아 포획 필터 등을 통한 여과에 의해, 살균제 또는 방사를 혼입시켜 대개 살균된다. 살균된 조성물은 예를 들면 동결건조에 의해 고형 조성물을 수득하여 고형화시킬 수 있으며, 사용시에 이를 무균수 또는 무균 희석액에 용해시킨다.

14> 본 발명의 약제학적 조성물과 관련하여 사용되는 용어 “치료학적 유효량”은 본 발명의 조성물이 적용되는 암에 대해 개선 또는 치료 효과를 나타내는 활성성분의 양을 의미한다. 본 발명의 항암제 조성물의 치료학적 유효량은 환자의 연령, 성별, 적용부위, 투여회수, 투여시간, 제형, 보조제의 종류 등에 따라 변할 수 있지만, 야생형보다 적은 양으로 투여하면 되는데 예를 들면 0.01~1000  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{일}$ , 보다 바람직하게는 0.1~500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{일}$ , 가장 바람직하게는 1~100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{일}$ 로 투여한다.

65> 이하, 본 발명은 4-나선 다발 초가계 소속 사이토카인, 구체적으로 CNTF, EPO, F123L, G-CSF, GM-CSF, GRH, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p35, LPT, LIF, M-CSF, OSM, PL, SCF, TPO에 대하여 각각의 고유의 결합 도메인내 페닐알라닌을 발린으로 치환한 4-나선 다발 초가계 소



속 사이토카인 변이체를 제공한다. 또한, 본 발명은 인터페론, 구체적으로 IFN- $\alpha$  2A, IFN- $\alpha$  2B, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\tau$ 에 대하여 각각의 고유의 결합 도메인내 페닐알라닌을 발린으로 치환한 인터페론 변이체를 제공한다.

- 한 부류의 특정 양태로서, 본 발명은 하기 단백질 변이체를 제공한다: (1) 야생형 CNTF의 아미노산 서열(서열번호 1)중 83번째, 98번째, 119번째, 152번째 또는 178번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 CNTF 변이체; (2) 야생형 EPO의 아미노산 서열(서열번호 2)중 138번째, 142번째 또는 148번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 EPO 변이체; (3) 야생형 Flt3L의 아미노산 서열(서열번호 3)중 6번째, 15번째, 81번째, 96번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 Flt3L 변이체; (4) 야생형 G-CSF의 아미노산 서열(서열번호 4)중 12번째, 86번째, 116번째, 143번째, 147번째 또는 163번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 G-CSF 변이체; (5) 야생형 GM-CSF의 아미노산 서열(서열번호 5)중 47번째, 103번째, 106번째, 113번째 또는 119번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GM-CSF 변이체; (6) 야생형 GRH의 아미노산 서열(서열번호 6)중 1번째, 10번째, 31번째, 44번째, 97번째, 139번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GRH 변이체; (7) 야생형 IFN- $\alpha$  2A의 아미노산 서열(서열번호 7)중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\alpha$  2A 변이체; (8) 야생형 IFN- $\alpha$  2B의 아미노산 서열(서열번호 8)중 28번째, 37번째, 39번째, 44번째, 48번째, 65번째, 68번째, 85번째, 124번째 또는 152번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\alpha$  2B 변이체; (9) 야생형 IFN- $\beta$ 의 아미노산 서열(서열번호 9)중 8번째, 38번째, 50번째, 67번째, 70번째, 111번째 또는 154번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\beta$  변이체; (10) 야생형 IFN- $\gamma$ 의 아미노산 서열(서열번호 10)중 18번째, 32번째, 55번째, 57번째, 60번째, 84번째, 85번째, 95번째 또는 139번째 페닐알라닌을 발린으로

치환한 IFN- $\gamma$  변이체; (11) 야생형 IFN- $\omega$ 의 아미노산 서열(서열번호 11)중 27번째, 36번째, 38번째, 65번째, 68번째, 124번째 또는 153번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\omega$  변이체; (12) 야생형 IFN- $\tau$ 의 아미노산 서열(서열번호 12)중 8번째, 39번째, 68번째, 71번째, 88번째, 127번째, 156번째, 157번째, 159번째 또는 183번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\tau$  변이체; (13) 야생형 IL-2의 아미노산 서열(서열번호 13)중 42번째, 44번째, 78번째, 103번째, 117번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-2 변이체; (14) 야생형 IL-3의 아미노산 서열(서열번호 14)중 37번째, 61번째, 107번째, 113번째 또는 133번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-3 변이체; (15) 야생형 IL-4의 아미노산 서열(서열번호 15)중 33번째, 45번째, 55번째, 73번째, 82번째 또는 112번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-4 변이체; (16) 야생형 IL-5의 아미노산 서열(서열번호 16)중 49번째, 69번째, 96번째 또는 103번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-5 변이체; (17) 야생형 IL-6의 아미노산 서열(서열번호 17)중 73번째, 93번째, 104번째, 124번째, 169번째 또는 172번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-6 변이체; (18) 야생형 IL-12p35의 아미노산 서열(서열번호 18)중 13번째, 39번째, 82번째, 96번째, 116번째, 132번째, 150번째, 166번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-12p35 변이체; (19) 야생형 LPT의 아미노산 서열(서열번호 19)중 41번째 또는 91번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LPT 변이체; (20) 야생형 LIF의 아미노산 서열(서열번호 20)중 41번째, 52번째, 67번째, 70번째, 156번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LIF 변이체; (21) 야생형 M-CSF의 아미노산 서열(서열번호 21)중 35번째, 37번째, 54번째, 67번째, 91번째, 106번째, 121번째, 135번째, 143번째, 255번째, 311번째, 439번째, 466번째 또

는 485번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 M-CSF 변이체; (22) 야생형 OSM의 아미노산 서열(서열번호 22)중 56번째, 70번째, 160번째, 169번째, 176번째, 또는 184번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 OSM 변이체; (23) 야생형 PL의 아미노산 서열(서열번호 23)중 10번째, 31번째, 44번째, 52번째, 54번째, 92번째, 97번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 PL 변이체; (24) 야생형 SCF의 아미노산 서열(서열번호 24)중 63번째, 102번째, 110번째, 115번째, 116번째, 119번째, 126번째, 129번째, 199번째, 205번째, 207번째 또는 245번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 SCF 변이체; 및 (25) 야생형 TPO의 아미노산 서열(서열번호 25)중 46번째, 131번째, 141번째, 186번째, 204번째, 240번째 또는 286번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 TPO 변이체.

- 67> 다른 부류의 특정 양태로서, 본 발명은 하기 DNA를 제공한다: (1) 야생형 CNTF의 아미노산 서열(서열번호 1)중 83번째, 98번째, 119번째, 152번째 또는 178번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 CNTF 변이체를 코딩하는 DNA; (2) 야생형 EPO의 아미노산 서열(서열번호 2)중 138번째, 142번째 또는 148번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 EPO 변이체를 코딩하는 DNA; (3) 야생형 Flt3L의 아미노산 서열(서열번호 3)중 6번째, 15번째, 81번째, 96번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 Flt3L 변이체를 코딩하는 DNA; (4) 야생형 G-CSF의 아미노산 서열(서열번호 4)중 12번째, 86번째, 116번째, 143번째, 147번째 또는 163번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 G-CSF 변이체를 코딩하는 DNA; (5) 야생형 GM-CSF의 아미노산 서열(서열번호 5)중 47번째, 103번째, 106번째, 113번째 또는 119번째 페닐알라닌을 발린

으로 치환한 GM-CSF 변이체를 코딩하는 DNA; (6) 야생형 GRH의 아미노산 서열(서열번호 6)중 1번째, 10번째, 31번째, 44번째, 97번째, 139번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GRH 변이체를 코딩하는 DNA; (7) 야생형 IFN- $\alpha$ 2A의 아미노산 서열(서열번호 7)중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\alpha$ 2A 변이체를 코딩하는 DNA; (8) 야생형 IFN- $\alpha$ 2B의 아미노산 서열(서열번호 8)중 28번째, 37번째, 39번째, 44번째, 48번째, 65번째, 68번째, 85번째, 124번째 또는 152번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\alpha$ 2B 변이체를 코딩하는 DNA; (9) 야생형 IFN- $\beta$ 의 아미노산 서열(서열번호 9)중 8번째, 38번째, 50번째, 67번째, 70번째, 111번째 또는 154번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\beta$  변이체를 코딩하는 DNA; (10) 야생형 IFN- $\gamma$ 의 아미노산 서열(서열번호 10)중 18번째, 32번째, 55번째, 57번째, 60번째, 84번째, 85번째, 95번째 또는 139번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\gamma$  변이체를 코딩하는 DNA; (11) 야생형 IFN- $\omega$ 의 아미노산 서열(서열번호 11)중 27번째, 36번째, 38번째, 65번째, 68번째, 124번째 또는 153번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\omega$  변이체를 코딩하는 DNA; (12) 야생형 IFN- $\tau$ 의 아미노산 서열(서열번호 12)중 8번째, 39번째, 68번째, 71번째, 88번째, 127번째, 156번째, 157번째, 159번째 또는 183번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\tau$  변이체를 코딩하는 DNA; (13) 야생형 IL-2의 아미노산 서열(서열번호 13)중 42번째, 44번째, 78번째, 103번째, 117번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-2 변이체를 코딩하는 DNA; (14) 야생형 IL-3의 아미노산 서열(

서열번호 14)중 37번째, 61번째, 107번째, 113번째 또는 133번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-3 변이체를 코딩하는 DNA; (15) 야생형 IL-4의 아미노산 서열(서열번호 15)중 33번째, 45번째, 55번째, 73번째, 82번째 또는 112번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-4 변이체를 코딩하는 DNA; (16) 야생형 IL-5의 아미노산 서열(서열번호 16)중 49번째, 69번째, 96번째 또는 103번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-5 변이체를 코딩하는 DNA; (17) 야생형 IL-6의 아미노산 서열(서열번호 17)중 73번째, 93번째, 104번째, 124번째, 169번째 또는 172번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-6 변이체를 코딩하는 DNA; (18) 야생형 IL-12p35의 아미노산 서열(서열번호 18)중 13번째, 39번째, 82번째, 96번째, 116번째, 132번째, 150번째, 166번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-12p35 변이체를 코딩하는 DNA; (19) 야생형 LPT의 아미노산 서열(서열번호 19)중 41번째 또는 91번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LPT 변이체를 코딩하는 DNA; (20) 야생형 LIF의 아미노산 서열(서열번호 20)중 41번째, 52번째, 67번째, 70번째, 156번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LIF 변이체를 코딩하는 DNA; (21) 야생형 M-CSF의 아미노산 서열(서열번호 21)중 35번째, 37번째, 54번째, 67번째, 91번째, 106번째, 121번째, 135번째, 143번째, 255번째, 311번째, 439번째, 466번째 또는 485번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 M-CSF 변이체를 코딩하는 DNA; (22) 야생형 OSM의 아미노산 서열(서열번호 22)중 56번째, 70번째, 160번째, 169번째, 176번째, 또는 184번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 OSM 변이체를 코딩하는 DNA; (23) 야생형 PL의 아미노산 서열(서열번호 23)중 10번째, 31번째, 44번째, 52번째, 54번째, 92번째,

97번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 PL 변이체를 코딩하는 DNA; (24) 야생형 SCF의 아미노산 서열(서열번호 24)중 63번째, 102번째, 110번째, 115번째, 116번째, 119번째, 126번째, 129번째, 199번째, 205번째, 207번째 또는 245번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 SCF 변이체를 코딩하는 DNA; 및 (25) 야생형 TPO의 아미노산 서열(서열번호 25)중 46번째, 131번째, 141번째, 186번째, 204번째, 240번째 또는 286번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 TPO 변이체를 코딩하는 DNA.

- 58> 또 다른 부류의 특정 양태로서, 본 발명은 하기 재조합 발현 벡터를 제공한다: (1) 야생형 CNTF의 아미노산 서열(서열번호 1)중 83번째, 98번째, 119번째, 152번째 또는 178번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 CNTF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (2) 야생형 EPO의 아미노산 서열(서열번호 2)중 138번째, 142번째 또는 148번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 EPO 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (3) 야생형 Flt3L의 아미노산 서열(서열번호 3)중 6번째, 15번째, 81번째, 96번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 Flt3L 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (4) 야생형 G-CSF의 아미노산 서열(서열번호 4)중 12번째, 86번째, 116번째, 143번째, 147번째 또는 163번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 G-CSF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (5) 야생형 GM-CSF의 아미노산 서열(서열번호 5)중 47번째, 103번째, 106번째, 113번째 또는 119번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GM-CSF 변이체를 코딩

하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (6) 야생형 GRH의 아미노산 서열(서열번호 6)중 1번째, 10번째, 31번째, 44번째, 97번째, 139번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GRH 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (7) 야생형 IFN- $\alpha$  2A의 아미노산 서열(서열번호 7)중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\alpha$  2A 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (8) 야생형 IFN- $\alpha$  2B의 아미노산 서열(서열번호 8)중 28번째, 37번째, 39번째, 44번째, 48번째, 65번째, 68번째, 85번째, 124번째 또는 152번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\alpha$  2B 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (9) 야생형 IFN- $\beta$ 의 아미노산 서열(서열번호 9)중 8번째, 38번째, 50번째, 67번째, 70번째, 111번째 또는 154번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\beta$  변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (10) 야생형 IFN- $\gamma$ 의 아미노산 서열(서열번호 10)중 18번째, 32번째, 55번째, 57번째, 60번째, 84번째, 85번째, 95번째 또는 139번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\gamma$  변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (11) 야생형 IFN- $\omega$ 의 아미노산 서열(서열번호 11)중 27번째, 36번째, 38번째, 65번째, 68번째, 124번째 또는 153번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\omega$  변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (12) 야생형 IFN- $\tau$ 의 아미노산 서열(서열번호 12)중 8번째, 39번째, 68번째, 71번째, 88번째,

127번째, 156번째, 157번째, 159번째 또는 183번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\tau$  변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (13) 야생형 IL-2의 아미노산 서열(서열번호 13)중 42번째, 44번째, 78번째, 103번째, 117번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-2 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (14) 야생형 IL-3의 아미노산 서열(서열번호 14)중 37번째, 61번째, 107번째, 113번째 또는 133번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-3 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (15) 야생형 IL-4의 아미노산 서열(서열번호 15)중 33번째, 45번째, 55번째, 73번째, 82번째 또는 112번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-4 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (16) 야생형 IL-5의 아미노산 서열(서열번호 16)중 49번째, 69번째, 96번째 또는 103번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-5 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (17) 야생형 IL-6의 아미노산 서열(서열번호 17)중 73번째, 93번째, 104번째, 124번째, 169번째 또는 172번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-6 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (18) 야생형 IL-12p35의 아미노산 서열(서열번호 18)중 13번째, 39번째, 82번째, 96번째, 116번째, 132번째, 150번째, 166번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-12p35 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (19) 야생형 LPT의 아미노산 서열(서열번호 19)중 41번째 또는 91번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LPT 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연



결된 재조합 발현 벡터; (20) 야생형 LIF의 아미노산 서열(서열번호 20)중 41번째, 52번째, 67번째, 70번째, 156번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LIF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (21) 야생형 M-CSF의 아미노산 서열(서열번호 21)중 35번째, 37번째, 54번째, 67번째, 91번째, 106번째, 121번째, 135번째, 143번째, 255번째, 311번째, 439번째, 466번째 또는 485번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 M-CSF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (22) 야생형 OSM의 아미노산 서열(서열번호 22)중 56번째, 70번째, 160번째, 169번째, 176번째, 또는 184번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 OSM 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (23) 야생형 PL의 아미노산 서열(서열번호 23)중 10번째, 31번째, 44번째, 52번째, 54번째, 92번째, 97번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 PL 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (24) 야생형 SCF의 아미노산 서열(서열번호 24)중 63번째, 102번째, 110번째, 115번째, 116번째, 119번째, 126번째, 129번째, 199번째, 205번째, 207번째 또는 245번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 SCF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; 및 (25) 야생형 TPO의 아미노산 서열(서열번호 25)중 46번째, 131번째, 141번째, 186번째, 204번째, 240번째 또는 286번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 TPO 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터.

또 다른 부류의 특정 양태로서, 본 발명은 하기 숙주세포를 제공한다:(1) 야

생형 CNTF의 아미노산 서열(서열번호 1)중 83번째, 98번째, 119번째, 152번째 또는 178번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 CNTF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (2) 야생형 EPO의 아미노산 서열(서열번호 2)중 138번째, 142번째 또는 148번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 EPO 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (3) 야생형 Flt3L의 아미노산 서열(서열번호 3)중 6번째, 15번째, 81번째, 96번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 Flt3L 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (4) 야생형 G-CSF의 아미노산 서열(서열번호 4)중 12번째, 86번째, 116번째, 143번째, 147번째 또는 163번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 G-CSF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (5) 야생형 GM-CSF의 아미노산 서열(서열번호 5)중 47번째, 103번째, 106번째, 113번째 또는 119번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GM-CSF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (6) 야생형 GRH의 아미노산 서열(서열번호 6)중 1번째, 10번째, 31번째, 44번째, 97번째, 139번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GRH 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (7) 야생형 IFN- $\alpha$ 2A의 아미노산 서열(서열번호 7)중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\alpha$ 2A 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (8) 야생형 IFN- $\alpha$ 2B의 아미노산 서열(서열번호 8)중 28번째, 37번째, 39번째, 44번째, 48번째, 65번째, 68번째, 85번째, 124번째 또는 152번째 페닐알라닌을 발

린으로 치환한 IFN- $\alpha$  2B 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (9) 야생형 IFN- $\beta$ 의 아미노산 서열(서열번호 9)중 8번째, 38번째, 50번째, 67번째, 70번째, 111번째 또는 154번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\beta$  변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (10) 야생형 IFN- $\gamma$ 의 아미노산 서열(서열번호 10)중 18번째, 32번째, 55번째, 57번째, 60번째, 84번째, 85번째, 95번째 또는 139번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\gamma$  변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (11) 야생형 IFN- $\omega$ 의 아미노산 서열(서열번호 11)중 27번째, 36번째, 38번째, 65번째, 68번째, 124번째 또는 153번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\omega$  변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (12) 야생형 IFN- $\tau$ 의 아미노산 서열(서열번호 12)중 8번째, 39번째, 68번째, 71번째, 88번째, 127번째, 156번째, 157번째, 159번째 또는 183번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\tau$  변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (13) 야생형 IL-2의 아미노산 서열(서열번호

13)중 42번째, 44번째, 78번째, 103번째, 117번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-2 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (14) 야생형 IL-3의 아미노산 서열(서열번호 14)중 37번째, 61번째, 107번째, 113번째 또는 133번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-3 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (15) 야생형 IL-4의 아미노산 서열(서열번호 15)중 33번째, 45번째, 55번째, 73번째, 82번째 또는 112번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-4 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (16) 야생형 IL-5의 아미노산 서열(서열번호 16)중 49번째, 69번째, 96번째 또는 103번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-5 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (17) 야생형 IL-6의 아미노산 서열(서열번호 17)중 73번째, 93번째, 104번째, 124번째, 169번째 또는 172번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-6 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (18) 야생형 IL-12p35의 아미노산 서열(서열번호 18)중 13번째, 39번째, 82번째, 96번째, 116번째, 132번째, 150번째, 166번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-12p35 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (19) 야생형 LPT의 아미노산 서열(서열번호 19)중 41번째 또는 91번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LPT 변이체를 코딩하는

DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포;

(20) 야생형 LIF의 아미노산 서열(서열번호 20)중 41번째, 52번째, 67번째, 70번째, 156번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LIF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (21) 야생형 M-CSF의 아미노산 서열(서열번호 21)중 35번째, 37번째, 54번째, 67번째, 91번째, 106번째, 121번째, 135번째, 143번째, 255번째, 311번째, 439번째, 466번째 또는 485번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 M-CSF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (22) 야생형 OSM의 아미노산 서열(서열번호 22)중 56번째, 70번째, 160번째, 169번째, 176번째, 또는 184번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 OSM 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (23) 야생형 PL의 아미노산 서열(서열번호 23)중 10번째, 31번째, 44번째, 52번째, 54번째, 92번째, 97번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 PL 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (24) 야생형 SCF의 아미노산 서열(서열번호 24)중 63번째, 102번째, 110번째, 115번째, 116번째, 119번째, 126번째, 129번째, 199번째, 205번째, 207번째 또는 245번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 SCF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; 및 (25) 야생형 TPO의 아미노산 서열(서열번호 25)중 46번째, 131번째, 141번째, 186번째, 204번째, 240번째 또는 286번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 TPO 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포.

70> 또 다른 부류의 특정 양태로서, 본 발명은 하기 단백질 변이체 제조방법을 제공한다: (1) 야생형 CNTF의 아미노산 서열(서열번호 1)중 83번째, 98번째, 119번째, 152번째 또는 178번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 CNTF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (2) 야생형 EPO의 아미노산 서열(서열번호 2)중 138번째, 142번째 또는 148번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 EPO 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (3) 야생형 Flt3L의 아미노산 서열(서열번호 3)중 6번째, 15번째, 81번째, 96번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 Flt3L 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (4) 야생형 G-CSF의 아미노산 서열(서열번호 4)중 12번째, 86번째, 116번째, 143번째, 147번째 또는 163번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 G-CSF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (5) 야생형 GM-CSF의 아미노산 서열(서열번호 5)중 47번째, 103번째, 106번째, 113번째 또는 119번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GM-CSF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (6) 야생형 GRH의 아미노산 서열(서열번호 6)중 1번째, 10번째, 31번째,

44번째, 97번째, 139번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GRH 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (7) 야생형 IFN- $\alpha$  2A의 아미노산 서열(서열번호 7)중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\alpha$  2A 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (8) 야생형 IFN- $\alpha$  2B의 아미노산 서열(서열번호 8)중 28번째, 37번째, 39번째, 44번째, 48번째, 65번째, 68번째, 85번째, 124번째 또는 152번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\alpha$  2B 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터

터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (9) 야생형 IFN- $\beta$ 의 아미노산 서열(서열번호 9)중 8번째, 38번째, 50번째, 67번째, 70번째, 111번째 또는 154번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\beta$  변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동 가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (10) 야생형 IFN- $\gamma$ 의 아미노산 서열(서열번호 10)중 18번째, 32번째, 55번째, 57번째, 60번째, 84번째, 85번째, 95번째 또는 139번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\gamma$  변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (11) 야생형 IFN- $\omega$ 의 아미노산 서열(서열번호 11)중 27번째, 36번째, 38번째, 65번째, 68번째, 124번째 또는 153번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\omega$  변이체를 코딩하는 DNA를 포함하는 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (12) 야생형 IFN- $\tau$ 의 아미노산 서열(서열번호 12)중 8번째, 39번째, 68번째, 71번째, 88번째, 127번째, 156번째, 157번째, 159번째 또는 183번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\tau$  변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의



제조방법; (13) 야생형 IL-2의 아미노산 서열(서열번호 13)중 42번째, 44번째, 78번째, 103번째, 117번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-2 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (14) 야생형 IL-3의 아미노산 서열(서열번호 14)중 37번째, 61번째, 107번째, 113번째 또는 133번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-3 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (15) 야생형 IL-4의 아미노산 서열(서열번호 15)중 33번째, 45번째, 55번째, 73번째, 82번째 또는 112번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-4 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (16) 야생형 IL-5의 아미노산 서열(서열번호 16)중 49번째, 69번째, 96번째 또는 103번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-5 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (17) 야생형 IL-6의 아미노산 서열(서열번호 17)중 73번째, 93번째, 104번째, 124번째, 169번째 또는 172번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-6 변이체를 코딩하는 DNA

가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (18) 야생형 IL-12p35의 아미노산 서열(서열번호 18)중 13번째, 39번째, 82번째, 96번째, 116번째, 132번째, 150번째, 166번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-12p35 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (19) 야생형 LPT의 아미노산 서열(서열번호 19)중 41번째 또는 91번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LPT 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (20) 야생형 LIF의 아미노산 서열(서열번호 20)중 41번째, 52번째, 67번째, 70번째, 156번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LIF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (21) 야생형 M-CSF의 아미노산 서열(서열번호 21)중 35번째, 37번째, 54번째, 67번째, 91번째, 106번째, 121번째, 135번째, 143번째, 255번째, 311번째, 439번째, 466번째 또는 485번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 M-CSF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙

주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (22) 야생형 OSM의 아미노산 서열(서열번호 22)중 56번째, 70번째, 160번째, 169번째, 176번째, 또는 184번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 OSM 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (23) 야생형 PL의 아미노산 서열(서열번호 23)중 10번째, 31번째, 44번째, 52번째, 54번째, 92번째, 97번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 PL 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (24) 야생형 SCF의 아미노산 서열(서열번호 24)중 63번째, 102번째, 110번째, 115번째, 116번째, 119번째, 126번째, 129번째, 199번째, 205번째, 207번째 또는 245번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 SCF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; 및 (25) 야생형 TPO의 아미노산 서열(서열번호 25)중 46번째, 131번째, 141번째, 186번째, 204번째, 240번째 또는 286번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 TPO 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법.

- > 본 발명은 하기 약제학적 조성물을 제공한다: (1) 야생형 CNTF의 아미노산 서열(서열번호 1)중 83번째, 98번째, 119번째, 152번째 또는 178번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 CNTF 변이체

및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (2) 야생형 EPO의 아미노산 서열(서열번호 2)중 138번째, 142번째 또는 148번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 EPO 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (3) 야생형 Flt3L의 아미노산 서열(서열번호 3)중 6번째, 15번째, 81번째, 96번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 Flt3L 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (4) 야생형 G-CSF의 아미노산 서열(서열번호 4)중 12번째, 86번째, 116번째, 143번째, 147번째 또는 163번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 G-CSF 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (5) 야생형 GM-CSF의 아미노산 서열(서열번호 5)중 47번째, 103번째, 106번째, 113번째 또는 119번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GM-CSF 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (6) 야생형 GRH의 아미노산 서열(서열번호 6)중 1번째, 10번째, 31번째, 44번째, 97번째, 139번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GRH 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물;

(7) 야생형 IFN- $\alpha$ 2A의 아미노산 서열(서열번호 7)중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\alpha$ 2A 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (8) 야생형 IFN- $\alpha$ 2B의 아미노산 서열(서열번호 8)중 28번째, 37번째, 39번째, 44번째, 48번째, 65번째, 68번째, 85번째, 124번째 또는 152번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\alpha$ 2B 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (9) 야생형 IFN- $\beta$ 의 아미노산 서열(서열번호 9)중 8번째, 38번째, 50번째, 67번째, 70번째, 111번째 또는 154번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\beta$  변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물;

(10) 야생형 IFN- $\gamma$ 의 아미노산 서열(서열번호 10)중 18번째, 32번째, 55번째, 57번째,

60번째, 84번째, 85번째, 95번째 또는 139번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\gamma$  변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (11) 야생형 IFN- $\omega$ 의 아미노산 서열(서열번호 11)중 27번째, 36번째, 38번째, 65번째, 68번째, 124번째 또는 153번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\omega$  변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (12) 야생형 IFN- $\tau$ 의 아미노산 서열(서열번호 12)중 8번째, 39번째, 68번째, 71번째, 88번째, 127번째, 156번째, 157번째, 159번째 또는 183번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- $\tau$  변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (13) 야생형 IL-2의 아미노산 서열(서열번호 13)중 42번째, 44번째, 78번째, 103번째, 117번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-2 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (14) 야생형 IL-3의 아미노산 서열(서열번호 14)중 37번째, 61번째, 107번째, 113번째 또는 133번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-3 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (15) 야

생형 IL-4의 아미노산 서열(서열번호 15)중 33번째, 45번째, 55번째, 73번째, 82번째 또는 112번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-4 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (16) 야생형 IL-5의 아미노산 서열(서열번호 16)중 49번째, 69번째, 96번째 또는 103번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-5 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (17) 야생형 IL-6의 아미노산 서열(서열번호 17)중 73번째, 93번째, 104번째, 124번째, 169번째 또는 172번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-6 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (18) 야생형 IL-12p35의 아미노산 서열(서열번호 18)중 13번째, 39번째, 82번째, 96번째, 116번째, 132번째, 150번째, 166번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-12p35 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (19) 야생형 LPT의 아미노산 서열(서열번호 19)중 41번째 또는 91번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LPT 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (20) 야생형 LIF의 아미노산 서열(서열번호 20)중 41번째, 52번째, 67번째, 70번째, 156번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LIF 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (21) 야생형 M-CSF의 아미노산 서열(서열번호 21)중 35번째, 37번째, 54번째, 67번째, 91번째, 106번째, 121번째, 135번째, 143번째, 255번째, 311번째, 439번째, 466번째 또는 485번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 M-CSF 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (22) 야생형 OSM의 아미노산 서열(서열번호 22)중 56번째, 70번째, 160번째, 169번째, 176번째,

또는 184번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 OSM 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (23) 야생형 PL의 아미노산 서열(서열번호 23)중 10번째, 31번째, 44번째, 52번째, 54번째, 92번째, 97번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 PL 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (24) 야생형 SCF의 아미노산 서열(서열번호 24)중 63번째, 102번째, 110번째, 115번째, 116번째, 119번째, 126번째, 129번째, 199번째, 205번째, 207번째 또는 245번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 SCF 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; 및 (25) 야생형 TPO의 아미노산 서열(서열번호 25)중 46번째, 131번째, 141번째, 186번째, 204번째, 240번째 또는 286번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 TPO 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

2> 이하, 실시예에서는 EPO, TPO를 이용하여 본 발명이 이루고자 하는 생리활성 조절의 효능을 증대시키는 목적을 달성할 수 있음을 알 수 있었다. 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진자에게 있어서 자명할 것이다.

### 3> 실시예 1

#### 4> A. 야생형 TPO를 코딩하는 DNA의 제조

- 75> 추출한 골수에 트라이졸 용액(TRIZOL reagent, USA) 750 $\mu$ l를 첨가하여 골고루 섞이게 한 후, 핵단백질 복합체(nucleoprotein complex)가 완전히 분해될 때까지 약 5분간 실온에서 반응시켰다. 이 튜브에 200 $\mu$ l의 클로로포름을 넣고 15초간 잘 흔들어 준 후, 실온에서 2~3분간 더 반응시킨 다음, 4℃에서 15,000rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 최상층액을 새로운 1.5ml 튜브로 옮기고 500 $\mu$ l의 이소프로필 알코올을 첨가하여 잘 흔들어주고 영하 70℃에서 30분 동안 반응시킨 다음, 4℃에서 15,000rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 상층액을 버린 다음 침전물을 75% 디이피씨-에탄올 (DEPC-ethanol)로 한차례 세척하고 4℃에서 15,000rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 상층액을 버린 다음 실온에서 침전물을 너무 마르지 않게 조심하면서 5분간 말리고, RNA를 디이피씨-3차 증류수 50 $\mu$ l로 녹였다.
- 76> cDNA 합성은 상기 1.5ml 튜브에 정제된 2 $\mu$ g mRNA와 1 $\mu$ l 올리고 디티30 프라이머[oligo dT30 primer (10 $\mu$ M), Promega, USA]를 넣고 70℃에서 2분간 가열한 후 얼음에 넣어 2분간 식혔다. 이 혼합물에 200U 엠-엠엘브이 역전사효소[M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA)], 10 $\mu$ l 5배 반응완충용액[reaction buffer 250mM 트리스-에이치씨엘 (Tris-HCl), pH 8.3, 375mM 염화칼륨 (KCl), 15mM 염화마그네슘 (MgCl<sub>2</sub>), 50mM 디티티 (DTT)], 1 $\mu$ l 디엔티피[dNTP (각각 10mM의 농도, Takara, Japan)]를 넣고 디이피씨 [DEPC (Sigma, USA)]를 처리한 3차 증류수로 50 $\mu$ l가 되도록 첨가한 후, 42℃에서 1시간 반응시켜 1차 cDNA를 합성하였다.
- 77> 상기에서 얻어진 1차 cDNA를 주형으로 하고, 프라이머로는 하기 표 1에 기재된 프라이머 1 및 프라이머 2를 이용하는 중합효소 연쇄반응으로 사람의 야생형 TPO를 코딩하는 DNA를 제조하였다. 중합효소 연쇄반응은 3 $\mu$ l 1차 cDNA, 2U 피에프유 DNA 폴리머라제[pfu DNA polymerase (Stratagene, USA)], 10 $\mu$ l 10배 반응완충 용액, 1% 트리톤 엑스-100(Triton X-100), 1mg/ml 우혈청알부민(BSA), 3 $\mu$ l 프라이머1 (10 $\mu$ M), 3 $\mu$ l 프라이머2 (10 $\mu$ M), 2 $\mu$ l 디엔티피(dNTP, 각각 10



mM)를 넣고 3차 증류수로 100 $\mu$ l가 되도록 첨가한 후 실시하였다. 반응 조건은 95℃에서 3분간 처리한 다음 95℃에서 30초, 52℃에서 1분, 72℃에서 1분 30초씩 30회 반응시키고, 72℃에서 10분간 더 반응시켜 중합효소 연쇄반응 산물이 완전한 평활 말단(blunt end)이 되도록 하였다.

- 78> 상기 중합효소 연쇄반응 산물은 0.8% 아가로스 젤[agarose gel (BMA, USA)]에 전기 영동한 후, 큐어엑스 투 젤 추출 키트[Qiaex II gel extraction kit (Qiagen, USA)]를 이용하여 순수 분리하였다. 15U *Eco*RI (Takara, Japan)과 10U *Not* I (Takara, Japan), 3 $\mu$ l 10배 반응완충 용액을 섞은 후, 3차 증류수로 30 $\mu$ l가 되도록 첨가한 후 37℃에서 2시간 반응시켰다. 반응물을 0.8% 아가로스 젤에 전기 영동한 후, 큐어엑스 투 젤 추출 키트로 순수 분리하였다.
- 9> 벡터로 사용할 5 $\mu$ g 피블루스크립트 케이에스투(+) [pBluescript KSII(+)] (Stratagene, USA)]를 15U *Eco*RI과 10U *Not* I, 3 $\mu$ l 10배 반응완충용액을 섞은 후, 3차 증류수로 30 $\mu$ l가 되도록 첨가한 후 37℃에서 2시간 반응시켰다. 반응물을 0.8% 아가로스 젤에 전기 영동한 후, 큐어엑스 투 젤 추출 키트로 순수 분리하였다.
- 0> 이렇게 제조된 벡터 100ng에 앞서 제한효소로 처리된 중합효소 연쇄반응 산물 20ng을 넣고 0.5U 티포 DNA 리가아제[T4 DNA ligase (Amersham, USA)], 1 $\mu$ l 10배 반응완충용액을 넣은 후 3차 증류수로 10 $\mu$ l가 되도록 첨가한 후 16℃ 수조(water bath)에서 16시간 동안 반응시켜서, 야생형 TPO를 코딩하는 DNA를 포함하는 재조합 벡터를 제조하였다. 대장균[

*E. coli* Top10 (Invitrogen, USA)]을 루비듐 클로라이드(rubidium chloride)법으로 컴피턴트 세포(competent cell)를 만든 후 상기 재조합 벡터로 트랜스펙션시켜 암피실린[ampicillin (Sigma, USA)]을 50 $\mu$ g/ml 함유한 엘비 한천 평판배지(LB medium)에 도말하고 37℃에서 16시간 배양하였다. 생성된 콜로니들을 암피실린이 50 $\mu$ g/ml 함유된 엘비 액체 배양액(LB broth) 3ml에 접종한 후 37℃에서 16시간동안 진탕 배양하였다. 이 중 1ml을 알카라인 분해(alkaline lysis)법으로 플라스미드 미니-프레퍼레이션(plasmid mini-preparation)한 후 *Eco*RI과 *Not* I으로 절단하여 클로닝의 유무를 확인하였다.

- 1> 전술된 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 사용한 역전사-중합효소연쇄반응시 최적의 어닐링(annealing) 온도는 52℃ 이었으며, 이때 1062bp 가량의 TPO DNA 밴드가 증폭되었다. 한편, 중합효소 연쇄반응 산물의 염기서열이 기존의 보고와 동일함을 엔씨비아이 진뱅크 블라스트 서치 (NCBI genbank BLAST search)를 이용하여 확인하였다.

#### > B. 야생형 EPO를 코딩하는 DNA의 제조

- > 야생형 EPO를 코딩하는 DNA는 전술한 야생형 TPO를 코딩하는 DNA를 제조하는 과정과 동일한 절차에 따라 제조하였다.
- > 골수에서 추출한 mRNA를 주형으로 하는 역전사-중합효소 연쇄반응으로 제조된 1차 cDNA를 주형으로 하고, 프라이머로는 하기 표 2에 기재된 프라이머 11 및 프라이머 12를 이용하는 중합효소 연쇄반응으로 사람의 야생형 EPO를 코딩하는 DNA를 제조하였다. 상기 중합효소 연쇄반응 산물을 제한효소 *Eco*RI과 *Bam*HI 로 소화시키고, 시판되고 있는 클로닝 벡터 피블루스크립트

케이에스투(+) [pBluescript KSII(+)] (Stratagene, USA)]의 EcoRI/BamHI 부위에 삽입하여 클로닝하였다. 대장균 [*E. coli* Top10 (Invitrogen, USA)]을 루비듐 클로라이드(rubidium chloride)법으로 컴피턴트 세포(competent cell)를 만든 후 상기 재조합 벡터로 트랜스펙션시켜 이를 배양하였다. 이로부터 수득한 배양물 1ml을 알카라인 분해(alkaline lysis)법으로 플라스미드 미니-프레퍼레이션 (plasmid mini-preparation)한 후 *Eco*RI과 *Bam*HI으로 절단하여 클로닝의 유무를 확인하였다.

5> 실시예 2

6> A. 본 발명에 따른 TPO 변이체를 코딩하는 DNA의 제조

7> TPO의 D-알파 나선에 있는 페닐알라닌을 발린으로 치환한 변이체(TPO-[F131V] 및 TPO-[F141V])와 비교예로서 상기 D-알파 나선을 제외한 부분에 있는 페닐알라닌을 발린으로 치환한 변이체(TPO-[F46V] 및 TPO-[F128V])를 제조하였다.

> 【표 1】

야생형 TPO 및 본 발명에 따른 TPO 변이체를 코딩하는 DNA를 제조하는데 이용된 프라이머			핵산서열	서열 번호
1	야생형 TPO	센스	5'-CGGAATTC CGATGGAGCTGACTGAATTG-3'	26
2		안티센스	5'-TTTAGCGGCCGC ATTCTTACCCTTCCTGAG-3'	27
3	TPO-[F46V]	센스	T3	
4		안티센스	5'-CCAAGCTAAC GTCCACAGCAG-3'	28
5	TPO-[F128V]	센스	T3	
6		안티센스	5'-GCTCAGGAC GATGGCAT-3'	29
7	TPO-[F131V]	센스	T3	
8		안티센스	5'-GGTGTGGAC GCTCAGGAAGATG-3'	30
9	TPO-[F141V]	센스	T3	
10		안티센스	5'-CATCAGGAC ACGCACCTTTCC-3'	31

- 89> a. 본 발명에 따른 TPO 변이체를 코딩하는 DNA 및 이 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터의 제조
- 90> TPO-[F131V]/TPO-[F141V]/TPO-[F46V]/TPO-[F128V]를 코딩하는 DNA를 제조하기 위해서 실시예 1의 A에서 얻어진 피블루스크립트 케이애스 투(+)에 클로닝된 야생형 TPO를 코딩하는 DNA를 주형으로 상기 표 2에 특정된 1 $\mu$ l 프라이머(10 pmole)와 벡터 프라이머인 1 $\mu$ l 티3(T3)(10 pmole)을 가지고 1차 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 반응 조건은 2.5U Ex Taq(Takara, Japan), 5 $\mu$ l 10배 반응완충용액, 1mM 염화마그네슘, 4 $\mu$ l 디앤티피(각 2.5mM)를 넣고 3차 증류수로 50 $\mu$ l 가 되도록 첨가한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 처리한 다음 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초씩 30회 반응시키고, 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 더 반응시킨 후 중합효소 연쇄반응 산물을 0.8% 아가로스 겔에 전기 영동한 후, 큐어엑스 투 겔 추출 키트를 이용하여 순수 분리하여 메가 프라이머를 제조하였다. 이렇게 제조된 메가 프라이머와 벡터 프라이머인 1 $\mu$ l 티7(T7)(10 pmole)을 가지고 다시 피블루스크립트 케이애스 투(+)에 클로닝된 야생형 TPO를 코딩하는 DNA를 주형으로 2.5U Ex Taq (Takara, Japan), 5 $\mu$ l 10배 반응완충용액, 4 $\mu$ l 디앤티피 (각 2.5mM)를 넣고 3차 증류수로 50 $\mu$ l가 되도록 첨가한 후 2차 중합효소 연쇄반응을 실시하는데, 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 처리한 다음 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 58 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30회 반응시키고, 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 더 반응시켰다.
- 1> 여기서, 본 발명에 따른 TPO 변이체를 코딩하는 DNA의 제조를 위한 1차 중합효소 연쇄반응에서는 핵산 합성 오류를 최소화하기 위해서 마그네슘의 농도를 1mM로 하였고, 어닐링 온도 60 $^{\circ}$ C에서 TPO-[F46V]는 약 280bp, TPO-[F128V]는 약 520bp, TPO-[F131V]는 약 530bp, TPO-[F141V]는 약 560bp의 메가 프라이머를 확인할 수 있었다. 2차 중합효소 연쇄반응에서 사용한 메가 프라이머는 각각 TPO-[F46V]는 4 $\mu$ l, TPO-[F128V]는 2 $\mu$ l, TPO-[F131V]는 2 $\mu$ l, TPO-[F141V]는 2

$\mu$ l을 넣고 어닐링 온도는 58℃에서 실험을 수행한 결과 1062bp 가량의 밴드가 증폭되었음을 확인할 수 있었다. 또한 염기 서열 분석으로 원하는 위치에서 페닐알라닌이 발린으로 치환되었음을 확인할 수 있었다.

- 92> 상기 중합효소 연쇄반응 산물은 0.8% 아가로스 겔에 전기 영동한 후, 큐어엑스 투 겔 추출 키트를 이용하여 순수 분리하고 15U *EcoRI*과 10U *NotI*, 3 $\mu$ l 10배 반응완충용액, 3 $\mu$ l 0.1% 우혈청 알부민을 섞은 후, 3차 증류수로 30 $\mu$ l가 되도록 첨가한 후 37℃에서 2시간 반응시켰다. 반응물을 0.8% 아가로스 겔에 전기 영동한 후, 큐어엑스 투 겔 추출 키트로 순수 분리하고 전술된 방법에 따라 피블루스크립트 케이애스 투(+)에 라이게이션 (ligation)하였다. 이렇게 생산된 재조합 발현 벡터 중에서 TPO-[F141V]를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터는 Tefficacin4로 명명되었고 부다페스트 협약하에 KCCM(Korean Culture Center of Microorganisms)에 2003년 6월 9일자로 기탁번호 KCCM-10500으로 국제기탁되었다.

- 93> B. 본 발명에 따른 EPO 변이체를 코딩하는 DNA 및 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터의 제조

- 94> EPO의 결합 도메인내에 있는 페닐알라닌을 발린으로 치환한 변이체(EPO-[F142V] 및 EPO-[F148V])와 비교예로서 상기 결합 도메인을 제외한 부분에 있는 페닐알라닌을 발린으로 치환한 변이체(EPO-[F48V] 및 EPO-[F138V])를 제조하였다.

## 15&gt; 【표 2】

야생형 EPO 및 본 발명에 따른 EPO 변이체를 코딩하는 DNA를 제조하는데 이용된 프라이머			핵산서열	서열번호
11	야생형 EPO	센스	5'-GGCGCGGAGATGGGGGT-3'	32
12		안티센스	5'-TGGTCATCTGTCCCTGTCCTG-3'	33
13	EPO-[F48V]	센스	T3	
14		안티센스	5'-GAC ATTAAC TTGGTGTCTGGGAC-3'	34
15	EPO-[F138V]	센스	5'-CTG TCCGAAACTCTTCCGAG-3'	35
16		안티센스	T7	
17	EPO-[F142V]	센스	5'-CGCAAAC TCG TCCGAGTCTACT-3'	36
18		안티센스	T7	
19	EPO-[F148V]	센스	5'-GAGTCTACTCCAATGTGGTGGG-3'	37
20		안티센스	T7	

> 본 발명에 따른 EPO 변이체를 코딩하는 DNA는 전술한 TPO 변이체를 코딩하는 DNA의 제조과정과 동일한 절차에 따라 제조하였다. EPO-[F142V]/ EPO-[F148V]/EPO-[F48V]/EPO-[F138V]를 코딩하는 DNA를 제조하기 위해서 실시예 1의 B에서 얻어진 피블루스크립트 케이애스 투(+)에 클로닝된 야생형 EPO를 코딩하는 DNA를 주형으로 상기 표 2에 특정된 1 $\mu$ l 프라이머(10 pmole)와 벡터 프라이머인 1 $\mu$ l 티3(T3)(10 pmole)을 가지고 1차 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 이로부터 제조된 메가 프라이머와 벡터 프라이머인 1 $\mu$ l 티7(T7)(10 pmole)을 가지고 다시 피블루스크립트 케이애스 투(+)에 클로닝된 야생형 EPO를 코딩하는 DNA를 주형으로 2차 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.

97> 여기서, 본 발명에 따라 변이된 EPO 변이체를 코딩하는 DNA의 제조를 위한 1차 중합효소 연쇄반응에서는 핵산 합성 오류를 최소화하기 위해서 마그네슘의 농도를 1mM로 하였고, 어닐링 온도 60℃에서 EPO-[F48V]는 약 300 bp, EPO-[F138V]는 약 550bp, EPO-[F142V]는 약 550bp, EPO-[F148V]는 약 550bp의 메가 프라이머를 확인할 수 있었다. 2차 중합효소 연쇄반응에서 사용한 메가 프라이머는 각각 EPO-[F48V]는 약 1 $\mu$ l, EPO-[F138V]는 1 $\mu$ l, EPO-[F142V]는 약 1 $\mu$ l, EPO-[F148V] 약 1 $\mu$ l를 넣고 어닐링 온도는 58℃에서 실험을 수행한 결과 580bp 가량의 밴드가 증폭되었음을 확인할 수 있었다. 또한 염기 서열 분석으로 원하는 위치에서 페닐알라닌이 발린으로 치환되었음을 확인할 수 있었다.

8> 상기 중합효소 연쇄반응 산물은 0.8% 아가로스 겔에 전기 영동한 후, 큐어엑스 투 겔 추출 키트를 이용하여 순수 분리하고 15U *EcoRI*과 10U *BamHI*, 3 $\mu$ l 10배 반응완충용액, 3 $\mu$ l 0.1% 우혈 청알부민을 섞은 후, 3차 증류수로 30 $\mu$ l가 되도록 첨가한 후 37℃에서 2시간 반응시켰다. 반응물을 0.8% 아가로스 겔에 전기 영동한 후, 큐어엑스 투 겔 추출 키트로 순수 분리하고 전술된 방법에 따라 피블루스크립트 케이애스 투(+)에 라이게이션 (ligation)하였다. 이렇게 생산된 재조합 발현 벡터 중에서 EPO-[F148V]를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터는 Refficacin4로 명명되었고 부다페스트 협약하에 KCCM(Korean Culture Center of Microorganisms)에 2003년 6월 9일자로 기탁번호 KCCM-10501로 국제기탁되었다.

### > 실시예 3

#### > A. 본 발명에 따른 TPO 변이체의 발현 및 정제

- .01> a. 양이온 지질-매개 트랜스펙션 방법을 이용한 형질전환체의 제조
- .02> 35mm 디쉬에 햄스터 난소 세포를 디쉬당  $1.5 \times 10^5$ 개로 10% 우태아혈청(Fetal bovine serum)을 함유한 디엠이엠 배지[DMEM medium (Gibco BRL, USA)]를 이용하여 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 18~24시간 배양하였다. 12×6mm 멸균 튜브에, 우태아혈청을 함유하지 않은 디엠이엠 배지 100 $\mu$ l에 실시예 2의 A에서 제조된 TPO 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터 1.5 $\mu$ g을 첨가한 용액과 우태아혈청을 함유하지 않은 디엠이엠 배지 100 $\mu$ l에 리포펙타민 용액(Invitrogen, USA) 6 $\mu$ l를 첨가한 용액을 혼합한 후 DNA-양이온 지질 용액 복합체 형성을 위해 45분 동안 실온에서 방치하였다. 앞서, 35mm 디쉬에서 배양한 햄스터 난소 세포를 우태아혈청을 함유하지 않은 디엠이엠 배지로 2회 씻은 다음 우태아혈청을 함유하지 않은 디엠이엠 배지 800 $\mu$ l를 첨가하고, DNA-양이온 지질 용액 복합체를 조심스럽게 뿌려주었다. 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 5시간 배양 후 20% 우태아혈청을 함유한 디엠이엠 배지 1ml를 첨가하였다. 다시 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 18~24시간 배양한 후 세포를 우태아혈청을 함유하지 않은 디엠이엠 배지로 2회 씻은 후 10% 우태아혈청을 함유한 디엠이엠 배지 2ml 첨가한 후 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 72시간 배양하였다.
- .03> b. ELISA 방법을 이용한 TPO 변이체의 발현 양상 분석
- .04> 앞서 양이온 지질-매개 트랜스펙션 방법으로 제조된 형질전환체에서 TPO 변이체의 발현여부를 확인하기 위하여 효소 면역 검사법(ELISA)을 실시하였다. 96 웰 플레이트 [96 well plate (Falcon, USA)]에 고트 안티-휴먼 TPO 폴리클로날 항체[Goat anti-human TPO Polyclonal antibody (R&D, USA)]를 코팅 용액 (0.1M Sodium bicarbonate, [pH 9.6] )을 사용하여 10 $\mu$ g/



ml이 되게 희석하여 100 $\mu$ l씩 분주하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 용액 (0.1% 트윈-20 함유 1배 인산완충용액)으로 3회 세척한 후 블로킹 용액 (1% 우혈청알부민, 5% 자당, 0.05% 소듐 아자이드)을 200 $\mu$ l 분주하여 실온에서 1시간 동안 방치한 다음 세척 용액으로 3회 세척하였다. 배양물 중 상층액(양이온 지질-매개 트랜스펙션 방법으로 제조된 형질전환체를 포함)을 희석 용액(0.1% 우혈청알부민, 0.05% 트윈-20 함유 1배 인산완충용액)으로 연속적으로 희석하였고 양성 대조군으로 25ng/ml 재조합 사람의 TPO (Calbiochem, USA)를, 음성 대조군으로 트랜스펙션하지 않은 햄스터 난소 세포의 배양액을 사용하여 동일하게 희석한 후 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 용액으로 3회 세척 후 바이오티닐레이티드 고트 안티-휴먼 티피오 안티바디 [Biotinylated goat anti-human TPO antibody (R&D, USA)]를 희석 용액을 사용하여 0.2 $\mu$ g/ml이 되도록 희석한 후 이를 100 $\mu$ l씩 분주하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 용액으로 3회 세척하고 스트렙타비딘-에이치알피 [Streptavidin-HRP (R&D, USA)]를 희석 용액으로 1:200 희석한 다음 100 $\mu$ l씩 분주하고 실온에 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 세척 용액으로 3회 세척한 후 티엠비 마이크로웰 퍼옥시다아제 서브스트레이트 시스템 [TMB microwell peroxidase substrate system (KPL, USA)]을 이용하여 발색시키고, 마이크로플레이트 리더 [microplate reader (BIO-RAD Model 550)]로 파장 630nm에 대한 흡광도를 측정하여 발현 여부를 확인하였다.

- > c. 웨스턴 블롯을 이용한 TPO 변이체의 발현양상 및 분자량 분석
- > 앞서 양이온 지질-매개 트랜스펙션 방법으로 제조된 형질전환체를 우태아 혈청을 제거하기 위해 초-에스-에스에프엠 투[CHO-S-SFM II (Gibco BRL, USA)]에서 배양한 후 배양액을 모아 0.20  $\mu$ m의 실린지 필터를 사용하여 세포 찌꺼기들을 제거하고 cut off가 30,000MW인 센트리콘

[centricon (Millipore, USA)]을 사용하여 농축시켰다. 5% 베타-메르캅토에탄올( $\beta$ -mercaptoethanol) 함유 5배 로딩 버퍼를 첨가한 후 10분간 끓인 다음 환원상태 에스디에스-페이지 (reduced SDS-PAGE)를 실시하였다. 스택킹 젤(Stacking gel)은 3.5% 아크릴아마이드 젤 [acrylamide gel (0.5M 트리스-에이치씨엘 [pH 6.8] , 0.4% 에스디에스)]을 사용하였으며, 러닝 젤(running gel)은 10% 아크릴아마이드 젤(1.5M 트리스-에이치씨엘 pH 8.8, 0.4% 에스디에스)을 사용하여 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 구멍 크기가  $0.4\mu\text{m}$ 인 웨스트란[Westran (PVDF transfermembrane, S&S)]에 350mA로 2시간 동안 전기 전이 시켰고, 이 때 25mM 트리스-192mM 글리신 (pH 8.3)-20% 메탄올을 완충용액으로 사용하였다. 막 전이 후 5% 탈지분유로 10분씩 3회 블로킹을 실시하였다. 이 후 바이오티닐레이티드 고트 안티-휴먼 티피오 안티바디 [biotinylated goat anti-human TPO antibody (R&D, USA)]를 블로킹 용액으로  $0.25\mu\text{g/ml}$ 이 되게 희석하고 이를 3mL 넣은 후 잘 흔들어 주면서 실온에서 6시간 반응시켰다. 세척 용액으로 3회 세척한 후 스트렙타비딘-에이치알피 [Streptavidin-HRP (serotec, USA)]를 블로킹 용액으로 1:100이 되도록 희석한 다음 1시간 반응시키고 세척 용액으로 3회 세척한 후 디에이비 서브스트레이트 키트 [DAB substrate kit (VECTOR LABORATORIES)]를 사용하여 제품 사용법에 준하는 방법으로 발색제를 만들었고, 이를 3mL 첨가한 후 실온에서 10분간 발색시켰다. 반응의 종료는 3차 증류수로 하였다.

- 7> 도 3a는 무혈청 배지에서 배양된 햄스터 난소 세포 배양액에서 발현된 TPO 단백질의 분자량을 확인한 결과를 나타낸 것으로, 양성 대조군인 rhTPO는 약 60kD, 음성 대조군으로 사용한 트랜스펙션하지 않은 햄스터 난소 세포의 배양액에서는 밴드가 보이지 않았으며, 야생형 TPO와 TPO 변이체들은 모두 90~110kD 가량의 분자량이 확인되었다.

38> B. 본 발명에 따라 변이된 EPO 변이체의 발현 및 정제

39> a. 양이온 지질-매개 트랜스펙션 방법을 이용한 형질전환체의 제조

10> 35mm 디쉬에 햄스터 난소 세포를 디쉬당  $1.5 \times 10^5$ 개로 10% 우태아혈청(Fetal bovine serum)을 함유한 디엠이엠 배지[DMEM medium (Gibco BRL, USA)]를 이용하여 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 18~24시간 배양하였다. 12×5mm 멸균 튜브에, 우태아혈청을 함유하지 않은 디엠이엠 배지 100 $\mu$ l에 실시예 2에서 제조된 피씨알 벡터 1.5 $\mu$ g을 첨가한 용액과 우태아혈청을 함유하지 않은 디엠이엠 배지 100 $\mu$ l에 리포펙타민 용액(Invitrogen, USA) 6 $\mu$ l를 첨가한 용액을 혼합한 후 DNA-양이온 지질 용액 복합체 형성을 위해 45분 동안 실온에서 방치하였다. 앞서, 35mm 디쉬에서 배양한 햄스터 난소 세포를 우태아혈청을 함유하지 않은 디엠이엠 배지로 2회 씻은 다음 우태아혈청을 함유하지 않은 디엠이엠 배지 800 $\mu$ l를 첨가하고, DNA-양이온 지질 용액 복합체를 조심스럽게 뿌려주었다. 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 5시간 배양 후 20% 우태아혈청을 함유한 디엠이엠 배지 1ml를 첨가하였다. 다시 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 18~24시간 배양한 후 세포를 우태아혈청을 함유하지 않은 디엠이엠 배지로 2회 씻은 후 10% 우태아혈청을 함유한 디엠이엠 배지 2ml 첨가한 후 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 72시간 배양하였다.

1> b. ELISA 방법을 이용한 EPO 변이체의 발현 측정

2> 앞서 양이온 지질-매개 트랜스펙션 방법으로 제조된 형질전환체에서 EPO 변이체의 발현여부를 확인하기 위하여 효소 면역 검사법(ELISA)을 실시하였다. 96 웰 플레이트 [96 well plate (Falcon, USA)]에 염소 항-사람 EPO 폴리클로날 항체[Goat anti-human EPO Polyclonal antibody (R&D, USA)]를 코팅 용액 (0.1M Sodium bicarbonate, [pH 9.6] )을 사용하여 10ug/

ml이 되게 희석하여 100 $\mu$ l씩 분주하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 용액 (0.1% 트윈-20 함유 1배 인산완충용액)으로 3회 세척한 후 블로킹 용액 (1% 우혈청알부민, 5% 자당, 0.05% 소듐 아자이드)을 200 $\mu$ l 분주하여 실온에서 1시간 동안 방치한 다음 세척 용액으로 3회 세척하였다. 양이온 지질-매개 트랜스펙션 방법으로 제조된 형질전환체를 포함하는 상층액을 희석 용액(0.1% 우혈청알부민, 0.05% 트윈-20 함유 1배 인산완충용액)으로 연속적으로 희석하였고 양성 대조군으로 10IU/ml 재조합 사람의 EPO (Calbiochem, USA)를, 음성 대조군으로 트랜스펙션하지 않은 햄스터 난소 세포의 배양액을 사용하여 동일하게 희석한 후 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 용액으로 3회 세척 후 바이오티닐레이티드 고트 안티-휴먼 이피오 안티바디 [Biotinylated goat anti-human EPO antibody (R&D, USA)]를 희석 용액을 사용하여 0.2 $\mu$ g/ml이 되도록 희석한 후 이를 100 $\mu$ l씩 분주하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 용액으로 3회 세척하고 스트렙타비딘-에이치알피 [Streptavidin-HRP (R&D, USA)]를 희석 용액으로 1:200 희석한 다음 100 $\mu$ l씩 분주하고 실온에 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 세척 용액으로 3회 세척한 후 티엠비 마이크로웰 퍼옥시다아제 서브스트레이트 시스템 [TMB microwell peroxidase substrate system (KPL, USA)]을 이용하여 발색시키고, 마이크로플레이트 리더 [microplate reader (BIO-RAD Model 550)]로 파장 630nm에 대한 흡광도를 측정하여 발현 여부를 확인하였다.

- c. 웨스턴 블롯을 이용한 EPO 변이체의 발현양상 및 분자량 분석
- 앞서 양이온 지질-매개 트랜스펙션 방법으로 제조된 형질전환체를 우태아 혈청을 제거하기 위해 초-에스-에스에프엠 투[CHO-S-SFM II (Gibco BRL, USA)]에서 배양한 후 배양액을 모아 0.20  $\mu$ m의 실린지 필터를 사용하여 세포 찌꺼기들을 제거

하고 cut off가 30,000MW인 센트리콘[centricon (Millipore, USA)]을 사용하여 농축시켰다. 5% 베타-메르캅토에탄올( $\beta$ -mercaptoethanol) 함유 5배 로딩 버퍼를 첨가한 후 10분간 끓인 다음 환원상태 에스디에스-페이지 (reduced SDS-PAGE)를 실시하였다. 스택킹 젤(Stacking gel)은 3.5% 아크릴아마이드 젤[acrylamide gel (0.5M 트리스-에이치씨엘 [pH 6.8] , 0.4% 에스디에스)]을 사용하였으며, 러닝 젤(running gel)은 10% 아크릴아마이드 젤(1.5M 트리스-에이치씨엘 pH 8.8, 0.4% 에스디에스)을 사용하여 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 구멍 크기가  $0.4\mu\text{m}$ 인 웨스트란[Westran (PVDF transfermembrane, S&S)]에 350mA로 2시간 동안 전기 전이시켰고, 이 때 25mM 트리스-192mM 글리신 (pH 8.3)-20% 메탄올을 완충용액으로 사용하였다. 막 전이 후 5% 탈지분유로 10분씩 3회 블로킹을 실시하였다. 이 후 바이오티닐레이티드 고트 안티-휴먼 이피오 안티바디[biotinylated goat anti-human EPO antibody (R&D, USA)]를 블로킹 용액으로  $0.25\mu\text{g/ml}$ 이 되게 희석하고 이를 3mL 넣은 후 잘 흔들어 주면서 실온에서 6시간 반응시켰다. 세척 용액으로 3회 세척한 후 스트렙타비딘-에이치알피 [Streptavidin-HRP (serotec, USA)]를 블로킹 용액으로 1:100이 되도록 희석한 다음 1시간 반응시키고 세척 용액으로 3회 세척한 후 디에이비 서브스트레이트 키트[DAB substrate kit (VECTOR LABORATORIES)]를 사용하여 제품 사용법에 준하는 방법으로 발색제를 만들었고, 이를 3mL 첨가한 후 실온에서 10분간 발색시켰다. 반응의 종료는 3차 증류수로 하였다.

- > 도 3b는 무혈청 배지에서 배양된 햄스터 난소 세포 배양액에서 발현된 EPO 단백질의 분자량을 확인한 결과를 나타낸 것으로, 양성 대조군인 rhEPO는 약 36kD, 음성 대조군으로 사용한 트랜스펙션하지 않은 햄스터 난소 세포의 배양액에서는 밴드가 보이지 않았으며, 야생형 EPO와 EPO 변이체들은 모두 36kD 가량의 분자량이 확인되었다.

## 16&gt; 실시예 4

## 7&gt; A. EPO 수용체와 TPO 수용체를 코딩하는 DNA의 제조

8> EPO 또는 TPO 변이체와의 결합 친화력을 측정하기 위해서 각각에 대한 수용체(이하 EPO 수용체 또는 TPO 수용체)를 제조하였는데, 수용체의 카르복시기 말단에 human IgG1 Fc 부분을 붙여 재조합 발현 벡터를 제조하였다. 먼저 제한효소 EcoRI의 인식서열과 리더 서열의 코딩 서열을 갖는 한 프라이머(EPO 수용체의 경우:프라이머 21, TPO 수용체의 경우 : 프라미머 23)와 3' 말단서열과 면역글로불린 G1(IgG1)의 힌지부위(hinge region: H)의 5' 말단의 일부 서열을 코딩하는 안티센스 서열( EPO 수용체의 경우:프라이머 22, TPO 수용체의 경우: 프라이머 24)을 갖는 다른 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄반응으로 EPO 수용체 또는 TPO 수용체를 코딩하는 DNA 단편을 생성하였다. 이 단편과 면역글로불린 G1의 Fc 부위를 코딩하는 DNA 단편을 한 시험관에 혼합 한 후, 공통되는 서열사이에서 상보적 결합이 일어나도록 유도하였다. 이를 주형으로 EPO 수용체 또는 TPO 수용체의 5' 말단을 코딩하는 서열을 갖는 프라이머(EPO 수용체의 경우:프라이머 21, TPO 수용체의 경우:프라이머 23)와 IgG1 Fc의 3' 말단을 코딩하는 프라이머(프라이머 25)를 사용한 중합효소 연쇄반응을 일으켜, 상기 EPO 수용체 또는 TPO 수용체와 IgG1 Fc 부위의 DNA 단편의 서열을 포함하는 DNA 작제물을 증폭시켰다. 이를 제한효소 EcoRI 과 HindIII를 이용하여 절단한후 피씨알-3 발현벡터에 삽입하여 클로닝하였다.

【표 3】

	프라이머 번호		핵산 서열	서열 번호
EPO 수용체	21	센스	5'-CGGAATTCATGGACCACCTCGGGGCG-3'	38
	22	안티센스	5'-GCTCTAGACTAAGAGCAAGCCACATAGCTGGG-3'	39
TPO 수용체	23	센스	5'-CCCAAGCTTATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTC-3'	40
	24	안티센스	5'-GGAATTCTTACCCTTCTGAGACAGATTCTGG-3'	41
IgG1-R-XbaI	25		5'-GCTCTAGAGCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG-3'	42

10> B. EPO 수용체 및 TPO 수용체의 발현과 결합 친화력 측정

- 1> 이를 지질-매개 트랜스펙션 방법을 이용하여 상기 기술한 방법과 동일하게 햄스터 난소 세포에서 발현하였다. 이로부터 얻어진 배양액을 다음의 리간드-수용체 결합 친화력을 측정하는데 사용하였다. 96 웰 플레이트에 안티-휴먼아이쥬 안티바디(anti-human Ig antibody)를 코팅 용액(0.1M sodium bicarbonate, pH 9.6)을 사용하여 10ug/ml이 되게 희석하였다. well 당 100ul씩 분주하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 용액(0.1% Tween-20 함유 PBS)으로 3회 세척한 후 EPO 수용체 또는 TPO 수용체가 발현된 상층액을 1시간 동안 반응시켰다. 다시 세척 용액으로 3번 세척한 후 각각의 EPO 변이체 또는 TPO 변이체를 농도별로 1시간 동안 반응시켰다. 세척 용액으로 다시 3번 세척한 후 바이오티닐레이티드 안티-EPO 안티바디(biotinylated anti-EPO antibody) 또는 바이오티닐레이티드 안티-TPO 안티바디(biotinylated anti-TPO antibody(R&D, USA))를 이용하여 1시간 동안 반응시켰다. 세척 용액으로 3번 세척한 후 스트렙타비딘-에이치알피 안티바디[Streptavidin-HRP antibody (serotec, USA)]를 이용하여 1시간 더 반응시켰다. 세척용액으로 3번 세척후 티엠비 마이크로웰 퍼옥시다아제 서브스트레이트 시스템 [TMB microwell peroxidase substrate system (KPL, USA)]을 이용하여 발색시

키고, 마이크로플레이트 리더 [microplate reader (BIO-RAD Model 550)]로 파장 655nm에 대한 흡광도를 측정하였다.

- 22> 도 4a는 TPO 수용체에 대한 TPO 변이체들의 결합 친화력을 보여주는 결과로서, TPO-[F141V]가 가장 높은 결합 친화력을 보여주고 있으며 TPO-[F131V]는 야생형 TPO 보다 약간 높은 결합 친화력을 나타내었다. 도 4b는 EPO 수용체에 대한 EPO 변이체들의 결합 친화력을 보여주는 결과로서, EPO-[F148V]가 가장 높은 결합 친화력을, 그 다음 EPO-[F142V], 야생형 EPO 순으로 나타났다. 이러한 결과는 나선의 +1 위치(도 1a참조)의 페닐알라닌을 발린으로 치환한 TPO-[F141V]와 EPO-[F148V]가 가장 높고, 중심이 되는 +1로부터 멀어질수록 결합 친화력이 낮아짐을 확인시켜 주었다. 즉, 상기 변이체들이 +1 위치에 덜 가까운 EPO -[F142V]와 TPO-[F131V] 보다 결합 친화력이 높다는 사실을 비교 확인할 수 있었다.

- 23> C. 본 발명에 따른 TPO 변이체에 대한 SPR 에세이

- 24> TPO-[F141V] 또는 TPO-[F131V]와 실시예 4에서 제조한 TPO 수용체간의 결합 친화력의 차이를 측정하기 위하여 에스피알 [SPR (surface plasmon resonance)] 에세이를 수행하였다. 에스피알 에세이는 수용체-리간드 또는 수용체-항체 사이의 결합 친화력을 측정하기 위한 실험으로 수용체에 리간드가 결합하게 되면 밀도가 증가하게 되어 그 양의 변화를 측정하여 얼마나 결합 친화력을 가지고 있는지 비교하는 것이다.

- 25> 먼저 센서 칩(sensor chip)을 넣어 도킹(docking)한 다음에, 미세유로와 칩에 완충액을 흘려 주어 프라이밍(priming)을 하고, 20~30% 글리세롤을 이용하여 노말라이징(normalising)시킨다. 노말라이징(normalising) 용액으로 세척한 다음, 미세유로와



칩을 다시 완충용액으로 채운다. 안티-휴먼 아이퀴쥐 안티바디(anti-human IgG antibody)에 가장 잘 붙는 조건을 맞추기 위해서 소듐 아세테이트 (pH4~6)의 pH를 조절하여 프리콘센트레이션(preconcentration) 검사를 실시하고, 칩이 활성화할 수 있는 잔기를 가지도록 활성화 단계를 거친 다음, 10분 이내에 고정화하도록 한다. 1M 에탄올아민(ethanolamine)으로 나머지 활성화 잔기를 불활성화시키고, TPO 수용체를 흘려주어 안티-휴먼 아이퀴쥐 안티바디(anti-human IgG antibody)와 결합할 수 있도록 한 다음, 야생형 TPO/TPO-[F141V]/TPO-[F131V]를 각각 다시 흘려주어 TPO 수용체와 결합시킨 후, 염 또는 산성 용액을 사용하여 TPO 수용체와 결합한 각각의 TPO들을 분리시켜준다.

16> 도 5a는 야생형 TPO 및 TPO-[F141V]에 대한 SPR 에세이 결과를 나타낸 것이다. 일반적으로, 같은 농도의 리간드를 넣어주었을 때 RU(resonance unit)가 높을수록 그 수용체에 대한 결합 친화력이 더 크다는 것을 의미한다. 상기 도면에 따르면, 야생형 TPO가 10RU임에 비해서 TPO-[F141V]는 30RU, TPO-[F131V]는 20RU를 나타내었다. 이는 TPO-[F141V]가 TPO 수용체에 대해서 가장 높은 결합 친화력을 가진다는 것을 보여준다.

7> D. 본 발명에 따른 EPO 변이체에 대한 SPR 에세이

8> EPO-[F148V] 또는 EPO-[F142V]와 실시예 4에서 제조된 EPO 수용체간의 결합 친화력의 차이를 측정하기 위하여 전술한 TPO 변이체에 대한 에스피알 에세이와 동일한 방식으로 에스피알[SPR (surface plasmon resonance)] 에세이를 수행하였다.

- 29> 도 5b는 EPO 수용체에 대한 EPO 변이체들의 결합 친화력을 보여주는 결과로서, EPO-[F148V]는 40RU로, EPO-[F142V]는 30RU로 나와서 F148V로 치환된 EPO 변이체가 EPO 수용체와 가장 결합 친화력이 크다는 것을 확인할 수 있었다.

#### 0> 실시예 5

##### 1> A. TF-1/*c-Mpl* 세포의 제조

- 2> 본 발명에 따른 TPO 및 EPO 변이체의 해당 수용체에 대한 결합 친화력을 측정하기 위해서 상기 분석에 필요한 TF-1/*c-Mpl* 세포를 제조하였다. 이 세포는 EPO 수용체를 발현하고 있는 TF-1 세포에 지속적으로 TPO 수용체를 발현하도록 *c-Mpl*을 트랜스펙션하여 구축하였다.
- 3> 이렇게 제조된 TF-1/*c-Mpl* 세포가 *c-Mpl*을 지속적으로 발현하고 있는지 여부를 확인하기 위해서 먼저 *c-Mpl*에 대한 팩스 분석을 실시하였다. ml당  $1 \times 10^6$ 개의 TF-1/*c-Mpl* 세포를 1배 인산 완충용액으로 세척하고 정제된 씨-엠피엘 마우스 안티-휴먼 모노클로날 안티바디 [*c-Mpl* purified mouse anti-human monoclonal antibody (BD PharMingen, USA)]를 처리한 다음 안티-마우스 아이쥐쥐 에프아이티씨 콘쥬게이트 [Anti-mouse IgG (whole molecule) FITC conjugate (Sigma, USA)]를 붙인 다음 팩스를 수행하였다. 그 결과 음성대조군인 TF-1 세포에서보다 TF-1/*c-Mpl* 세포에서 그래프가 오른쪽으로 이동한 것을 확인할 수 있었으며, 이는 TF-1/*c-Mpl* 세포에서 *c-Mpl*이 지속적으로 발현되고 있음을 의미한다.

##### B. 본 발명에 따른 TPO 변이체에 대한 팩스 분석

35> TPO-[F141V]에 대한 팩스 분석을 다음과 같이 수행하였다.  $\mu$ 당  $1 \times 10^6$ 개의 TF-1/*c-Mpl* 세포를 1배 인산완충용액에 부유시키고, TPO 변이체를 처리하여 4℃에서 30~60분간 배양하였다. 그리고 바이오티닐레이티드 고트 안티-휴먼 티피오 폴리클로날 안티바디 [Biotinylated goat anti-human TPO polyclonal antibody (R&D, USA)]를 4℃에서 30~60분간 처리하고, 스트렙타비딘-에프아이티씨 [streptavidin-FITC (Sigma, USA)] 용액을 처리하여 다시 4℃에서 30~60분간 배양하였다. 세포를 1배 인산완충용액으로 2회 세척하여 반응하지 않은 스트렙타비딘-에프아이티씨 (streptavidin-FITC)를 제거하고 세포를 1배 인산완충용액에 부유시켜 488nm에서 flow cytometric analysis를 수행하였다.

> 도 6a는 TPO 수용체인 *c-Mpl*에 대한 야생형 TPO 및 TPO-[F141V]의 결합 친화력을 나타낸 것으로, 그 결과 TPO-[F141V]의 그래프가 야생형 TPO보다 더 오른쪽으로 이동한 것을 볼 수 있었다. 이것은 *c-Mpl*과 결합한 리간드의 양이 야생형 TPO보다 TPO-[F141V]가 더 많다는 것이고, 따라서 이는 TPO 수용체에 대한 결합 친화력은 TPO-[F141]가 동일한 농도의 야생형 TPO보다 더 높다는 것을 검증한다.

> C. 본 발명에 따른 EPO 변이체에 대한 팩스 분석

> EPO-[F148V]에 대한 팩스 분석은 전술한 TPO 변이체에 대한 팩스 분석과 동일한 절차로 수행하였다.

> 도 6b는 EPO 수용체에 대한 야생형 EPO 및 EPO-[F148V]의 결합 친화력을 나타낸 것으로, 그 결과 EPO-[F148V]의 그래프가 야생형 EPO보다 더 오른쪽으로 이동한 것을 볼 수 있었다. 이것은 EPO 수용체와 결합한 리간드의 양이 야생형 EPO보다 EPO-[F148V]가 더 많다는 것이고, 따라

서 이는 EPO 수용체에 대한 결합 친화력은 EPO-[F148V]가 같은 농도의 야생형 EPO 보다 훨씬 더 높다는 것을 증명하고 있다.

#### 10> 실시예 6

##### 11> A. 본 발명에 따른 TPO 변이체의 생물학적 활성도 측정

12> 야생형 TPO 및 본 발명에 따른 TPO 변이체들 각각의 분열 증식과 활성 효과를 측정하기 위하여 앞서 제조된 TF-1/*c-Mpl* 세포를 사용하였다. TF-1/*c-Mpl* 세포는 10% 우태아 혈청, 1ng/ml GM-CSF 함유 디엠이엠, 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 배양하였다. 이러한 TF-1/*c-Mpl* 세포를 96 구 효소면역검사판 [96 well plate (FALCON, USA)]에 총량이 100 $\mu$ l가 되도록, 우선 야생형 TPO 및 본 발명에 따른 TPO 변이체들을 각각 0.4, 1, 5, 10, 20, 40, 75 ng/ml 범위가 되도록 10% 우태아 혈청 함유 알피엠아이-1640으로 희석하여 넣고 TF-1/*c-Mpl* 세포는 well당  $1 \times 10^4$  개의 세포가 되도록 10% 우태아 혈청 함유 알피엠아이-1640으로 희석하여 넣어 주었다. 이것을 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 4일간 배양한 후 MTS 용액 [3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, MTS] 및 phenazine ethosulfate; PES ;promega)] 을 20 $\mu$ l씩 첨가한 후 4시간 동안 반응시키고 마이크로플레이트 리더 [microplate reader (BIO-RAD Model 550)]로 파장 490 nm에 대한 흡광도를 측정하여 활성도를 측정하였다.

3> 상기 과정 이전에 선행 실험을 통해서 well에 들어가는 세포 수와 TPO/EPO에 대한 반응 시간을 알아보았다. 각각의 최대 증식률을 비교해 본 결과 세포 수는 well당  $1 \times 10^4$ 개의 세포로, TPO/EPO와 반응 후 MTS 용액을 처리하는 시간은 4일 후로 결정하였다.

44> 도 7a는 본 발명에 따른 TPO 변이체의 생물학적 활성도 측정 결과를 나타낸 것으로, TPO의 세포 증식 정도는 TPO 농도 0.4ng/ml에서 75ng/ml 범위에서 실험을 수행하였다. TPO의 농도가 50ng/ml까지는 세포 증식 정도가 모두 증가하였으나, 그 농도 이상이 되면서부터 세포 증식력이 오히려 감소한다는 것을 확인할 수 있었다. TPO-[F141V]는 0.4ng/ml 가량의 농도에서 세포 증식이 시작되었고, 야생형 TPO보다 높은 생물학적 활성도를 나타내었다. TPO-[F131V]는 TPO-[F141V] 보다는 현저히 낮았고 야생형보다는 약간 높았다. TPO-[F46V]는 야생형 TPO와 유사한 활성도를 나타내었다.

> B. 본 발명에 따라 개량된 EPO 변이체의 생물학적 활성도 측정

> 앞서 제조된 EPO 변이체에 대한 분열 증식과 활성 효과의 측정은 전술한 TPO 변이체의 분열 증식과 활성 효과를 측정하는 방식과 동일한 절차로 수행되었다.

> 도 7b는 본 발명에 따른 EPO 변이체의 생물학적 활성도 측정 결과를 나타낸 것으로, EPO의 세포 증식 정도는 EPO 농도 0.001 내지 7IU/ml 범위에서 실험을 수행하였다. TPO와 마찬가지로 EPO의 농도가 증가함에 따라 세포 증식력도 증가하였다가 적정 농도를 초과하게 되면 오히려 세포 증식 능력이 감소한다는 것을 확인할 수 있었다. EPO-[F148V]는 0.001IU/ml 가량의 농도에서 세포 증식이 시작되어, 0.01IU/ml의 농도에서부터는 야생형 EPO보다 높은 활성도를 보였고, 1IU/ml이 지남에 따라 활성도가 감소하는 경향을 보였다. EPO-[F142V]는 EPO-[F148V] 보다는 약간 낮았고, EPO-[F48V]는 야생형보다 약간 높은 경향을 보였다.

- 8> 표 4 및 5는 각각 위의 생물학적 활성도 측정 결과를 토대로 하여 야생형 TPO와 EPO가 최대 활성도를 나타낼 때를 100%로 하여 각 변이체들의 효능을 비교한 것이다. TPO 변이체의 경우에는 TPO-[F141V]가 146%로 가장 높은 활성도를 나타내었고, 그 다음으로 TPO-[F131V]가 119%를 나타내었다. EPO 변이체 역시 EPO-[F148V]가 137%를 나타내어 가장 높은 활성도를 보여주었으며, 그 다음으로 EPO-[F142V]가 122%의 활성도를 나타내었다.

▷ 【표 4】

	TPO	최대활성도 비교(%)
야생형		100
변이체	TPO-[F46V]	107
	TPO-[F128V]	63
	TPO-[F131V]	119
	TPO-[F141V]	146

【표 5】

	EPO	최대활성도 비교(%)
야생형		100
변이체	EPO-[F48V]	84
	EPO-[F138V]	57
	EPO-[F142V]	122
	EPO-[F148V]	137

실시예 7

본 발명에 따른 TPO 변이체의 생체내 활성증가 검사

- 53> 본 발명에 따른 TPO 변이체가 조혈작용에 미치는 영향을 보기 위해서 *in vivo* assay를 수행하였다. 먼저 랫트 [Rat (8주령 암컷 SD, 250g, 샘타코, Korea)]을 700Rad에서 감마-이라디에이션( $\gamma$ -irradiation)시켜 조혈에 관여하는 세포들을 죽인 다음, 정제된 야생형 또는 TPO 변이체를 복강 주사하고, 꼬리에서 혈액을 200 $\mu$ l씩 채취한 후 CBC (complete blood counting) 검사를 수행하여 *in vivo*상에서 TPO 변이체의 효능을 확인하였다.
- 54> 정제된 야생형 TPO와 TPO 변이체를 각각 7500ng씩  $\gamma$ -irradiation한 날로부터 4일 동안 4회로 나누어 복강 주사하였으며, 양성 대조군은 야생형 TPO로, 음성 대조군은 햄스터 난소 세포 배양액으로 하여 실험하였다. 혈액은 주사한지 0일, 1일, 7일, 10일, 14일, 18일, 23일, 28일, 32일에 걸쳐서 채취하였으며, 이디티에이(EDTA)가 들어있는 튜브에 넣어 혈액응고를 방지하였다.
- 55> 도 8은 TPO를 복강 주사한 랫트의 CBC 검사결과를 나타낸 것으로 혈소판, 적혈구, 백혈구, 림프구, 중성구의 수치변화를 알아보았다. 혈소판은  $\gamma$ -irradiation한지 0일~7일 사이에 급격하게 감소하였다가 7일이 지나면서 증가하기 시작하였다. TPO-[F131V]와 TPO-[F141V]는 야생형 TPO보다 높은 수치를 보였고, TPO-[F46V]는 야생형 TPO와 유사한 수치의 혈소판 증가를 나타내었다. 그런데 TPO-[F128V]는 음성대조군과 비슷한 양상을 보여 조혈작용에 효과가 적음을 확인할 수 있었다. 적혈구와 림프구는  $\gamma$ -irradiation을 하고 난 후에도 급격한 감소를 보이지 않았고, TPO 변이체를 주사하였을때도 수치에 큰 영향을 받지 않음을 알 수 있었다. 백혈구와 림프구는  $\gamma$ -irradiation 후 0일~7일 사이에 급격하게 감소하였는데, 7일이 지나면서 회복이 되는 양상을 보였다. 23일경에는 TPO-[131V]와 TPO-[F141V]는 야생형 TPO보다 높은 백혈구 수치를 나타내었고, TPO-[F46V]는 야생형보다 낮은 수치를 보였다. 그러나 TPO-[F128V]는 혈소판 결과에서와 마찬가지로 음성대조군과 비슷한 수치변화를 보여주었다. 이런 결과로 볼

때 TPO는 혈소판과 백혈구 그리고 림프구의 생성에 영향을 주는 것을 알 수 있으며, 야생형 TPO와 비교하였을 때, TPO 변이체 중에서도 TPO-[F131V] 보다는 TPO-[F141V]가 더 높은 활성을 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

#### 【발명의 효과】

- 56> 이상의 본 발명의 결과들은 기존의 야생형 생리활성 조절 단백질들의 해당 수용체, 리간드 혹은 기질과의 결합에 관여하는 도메인내 페닐알라닌을 발린으로 치환시켰을 때 야생형 단백질 보다 증가된 결합 친화력과 생물활성 등의 유도할 수 있고, 또 기존 단백질 변이체의 자가항체 생성등의 문제점도 보완이 가능하여 우수한 개량형 약제 단백질의 제조가 가능해진다.



**【특허청구범위】****【청구항 1】**

수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인 내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체.

**【청구항 2】**

제 1항에 있어서, 상기 단백질이 사이토카인인 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

**【청구항 3】**

제 2항에 있어서, 상기 사이토카인이 4-알파 나선 다발 소속 사이토카인인 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

**【청구항 4】**

제 3항에 있어서, 상기 4-알파 나선 다발 소속 사이토카인이 CNTF, EPO, Flt3L, G-CSF, GM-CSF, GRH, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p35, LPT, LIF, M-CSF, OSM, PL, SCF, TPO 로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

**【청구항 5】**

제 4항에 있어서, 상기 CNTF는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열 중 83번째, 98번째, 119번째, 152번째 또는 178번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

**【청구항 6】**

제 4항에 있어서, 상기 EPO는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 중 138번째, 142번째 또는 148번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

**【청구항 7】**

제 4항에 있어서, 상기 Flt3L는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열 중 6번째, 15번째, 81번째, 96번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

**【청구항 8】**

제 4항에 있어서, 상기 G-CSF는 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열 중 12번째, 86번째, 116번째, 143번째, 147번째 또는 163번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

**【청구항 9】**

제 4항에 있어서, 상기 GM-CSF는 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열 중 47번째, 103번째, 106번째, 113번째 또는 119번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

**【청구항 10】**

제 4항에 있어서, 상기 GRH는 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열 중 1번째, 10번째, 31번째, 44번째, 97번째, 139번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

**【청구항 11】**

제 4항에 있어서, 상기 IL-2는 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열 중 42번째, 44번째, 78번째, 103번째, 117번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

**【청구항 12】**

제 4항에 있어서, 상기 IL-3는 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열 중 37번째, 61번째, 107번째, 113번째 또는 133번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

**【청구항 13】**

제 4항에 있어서, 상기 IL-4는 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열 중 33번째, 45번째, 55번째, 73번째, 82번째 또는 112번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

**【청구항 14】**

제 4항에 있어서, 상기 IL-5는 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열 중 49번째, 69번째, 96번째 또는 103번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

**【청구항 15】**

제 4항에 있어서, 상기 IL-6은 서열번호 17에 기재된 아미노산 서열 중 73번째, 93번째, 104번째, 124번째, 169번째 또는 172번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

**【청구항 16】**

제 4항에 있어서, 상기 IL-12p35는 서열번호 18에 기재된 아미노산 서열 중 13번째, 39번째, 82번째, 96번째, 116번째, 132번째, 150번째, 166번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

## 【청구항 17】

제 4항에 있어서, 상기 LPT는 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열 중 41번째 또는 91번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

## 【청구항 18】

제 4항에 있어서, 상기 LIF는 서열번호 20에 기재된 아미노산 서열 중 41번째, 52번째, 67번째, 70번째, 156번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

## 【청구항 19】

제 4항에 있어서, 상기 M-CSF는 서열번호 21에 기재된 아미노산 서열 중 35번째, 37번째, 54번째, 67번째, 91번째, 106번째, 121번째, 135번째, 143번째, 255번째, 311번째, 439번째, 466번째 또는 485번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

## 【청구항 20】

제 4항에 있어서, 상기 OSM는 서열번호 22에 기재된 아미노산 서열 중 56번째, 70번째, 160번째, 169번째, 176번째, 또는 184번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

## 【청구항 21】

제 4항에 있어서, 상기 PL은 서열번호 23에 기재된 아미노산 서열 중 10번째, 31번째, 44번째, 52번째, 54번째, 92번째, 97번째, 146번째, 166번째, 176번째, 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

## 【청구항 22】

제 4항에 있어서, 상기 SCF는 서열번호 24에 기재된 아미노산 서열 중 63번째, 102번째, 110번째, 115번째, 116번째, 119번째, 126번째, 129번째, 199번째, 205번째, 207번째, 245번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

## 【청구항 23】

제 4항에 있어서, 상기 TPO는 서열번호 25에 기재된 아미노산 서열 중 46번째, 131번째, 141번째, 186번째, 204번째, 240번째 또는 286번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

## 【청구항 24】

제 2항에 있어서, 상기 사이토카인이 인터페론인 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

## 【청구항 25】

제 24항에 있어서, 상기 인터페론이 IFN- $\alpha$  2A, IFN- $\alpha$  2B, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\tau$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

## 【청구항 26】

제 25항에 있어서, 상기 IFN- $\alpha$  2A는 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열 중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

## 【청구항 27】

제 25항에 있어서, 상기 IFN- $\alpha$  2B는 서열번호 8에 기재된 아미노산 서열 중 28번째, 37번째, 39번째, 44번째, 48번째, 65번째, 68번째, 85번째, 124번째 또는 152번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

## 【청구항 28】

제 25항에 있어서, 상기 IFN- $\beta$ 는 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열 중 8번째, 38번째, 50번째, 67번째, 70번째, 111번째 또는 154번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

## 【청구항 29】

제 25항에 있어서, 상기 IFN- $\gamma$ 는 서열번호 10에 기재된 아미노산 서열 중 18번째, 32번째, 55번째, 57번째, 60번째, 84번째, 85번째, 95번째 또는 139번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

## 【청구항 30】

제 25항에 있어서, 상기 IFN- $\omega$ 는 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열 중 27번째, 36번째 38번째, 65번째, 68번째, 124번째 또는 153번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

## 【청구항 31】

제 25항에 있어서, 상기 IFN- $\tau$ 는 서열번호 12에 기재된 아미노산 서열 중 8번째, 39번째, 68번째, 71번째, 88번째, 127번째, 156번째, 157번째, 159번째 또는 183번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

**【청구항 32】**

제 1항 내지 제 31항 중 어느 한 항에 따른 단백질 변이체를 코딩하는 DNA.

**【청구항 33】**

제 32항에 따른 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터.

**【청구항 34】**

제 33항에 따른 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포.

**【청구항 35】**

제 34항에 따른 숙주세포를 배양하고 이로부터 단백질 변이체를 분리하는 단계를 포함하는 단백질 변이체의 제조방법.

**【청구항 36】**

제 1항 내지 제 31항 중 어느 한 항에 따른 단백질 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

## 【도면】

【도 1a】

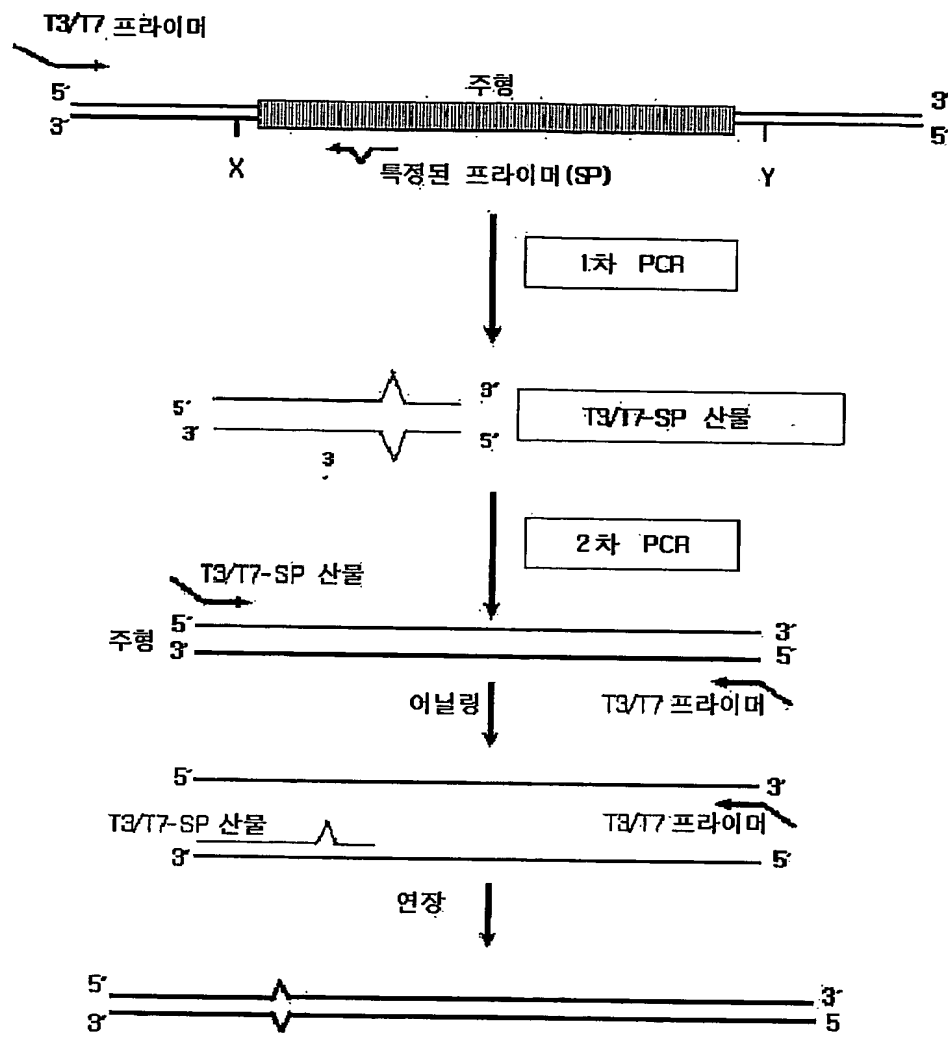
		-3	-7	-4	-3	-1	0	1	3	4	7	8	10	
huCNT	N' - R	N	E	A	D	G	H	P	I	N				
huEPO	N' - D	T	F <sup>111</sup>	E	K	L	F <sup>111</sup>	B	V	Y				
huG-CSF	N' - P	A	L	Q	P	T	Q	F	A	H				
huG-CSF	N' - I	T	F <sup>111</sup>	E	S	F <sup>111</sup>	K	E	N	L				
huGM	N' - Y	C	F <sup>111</sup>	E	K	D	H	D	K	V				
huIL-1 G	N' - K	N	Y	F <sup>111</sup>	T	S	V	A	H	P				
huIL-1 G	N' - Y	I	S	T	S	Q	A	E	H	H				
huIL-1Ra	N' - T	N	H	P	D	E	G	V	H	V				
huIL-2	N' - K	N	P	K	L	T	B	H	L	T				
huIL-3	N' - D	G	D	G	H	E	F <sup>111</sup>	E	R	K				
huIL-4	N' - P	V	K	E	A	H	Q	S	T	L				
huIL-5	N' - G	T	V	E	B	L	F <sup>111</sup>	K	N	L				
huIL-6	N' - R	A	V	Q	H	S	T	K	V	L				
huIL-1tp35	N' - K	T	K	I	K	L	C	I	L	L				
huILF	N' - G	H	V	D	V	T	Y	G	P	D				
huICSF	N' - G	S	H	Q	T	E	P	A	R	P				
huGM	N' - G	B	G	A	S	Q	P	P	T	P				
huPL	N' - Y	C	F <sup>111</sup>	E	K	D	H	D	K	V				
huSCF	N' - H	A	L	P	A	L	F <sup>111</sup>	S	L	I				
huTPO	N' - L	S	F <sup>111</sup>	Q	H	L	L	R	G	K				



h1L-10  
h1FN-α  
h1FN-α  
h1FN-α  
h1NF-1



【도 2】

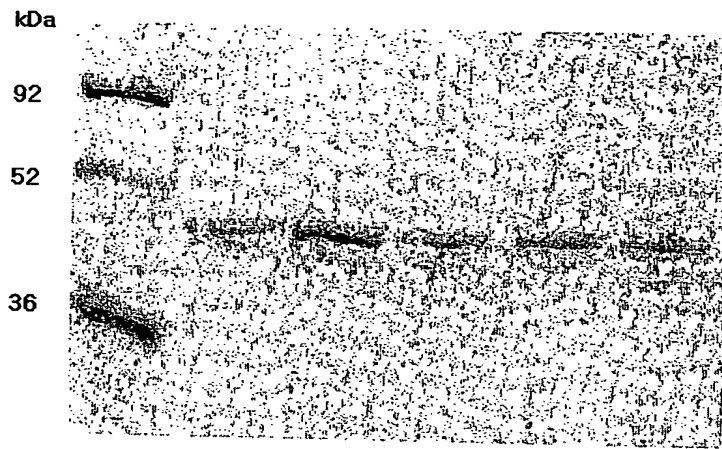


【도 3a】

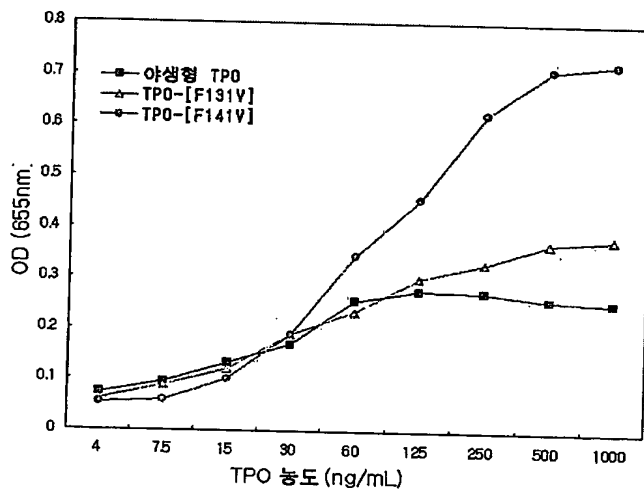
206kD  
124kD  
101kD  
55.4kD  
35.7kD  
29kD  
20.5kD  
8.7kD



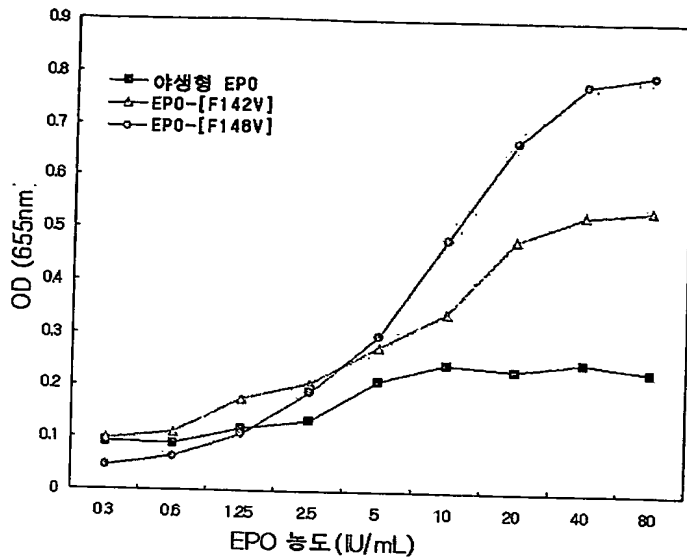
【도 3b】



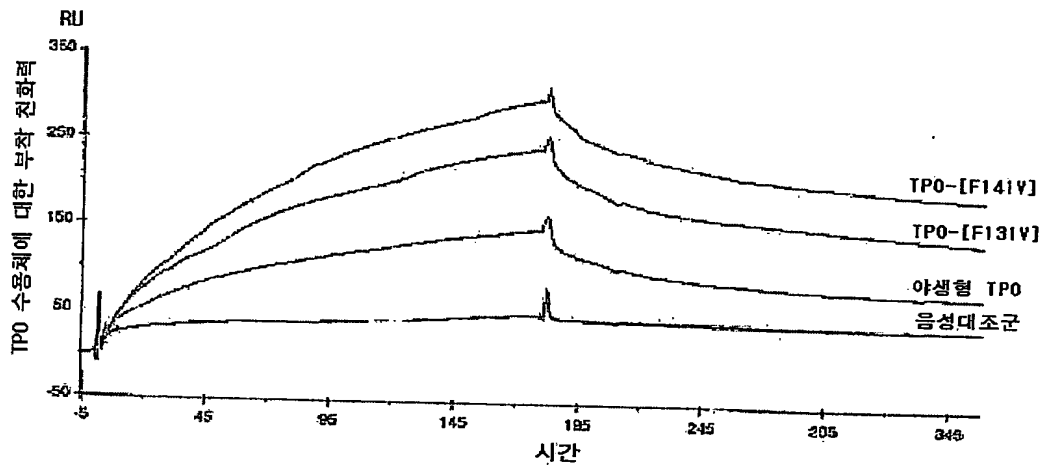
【도 4a】



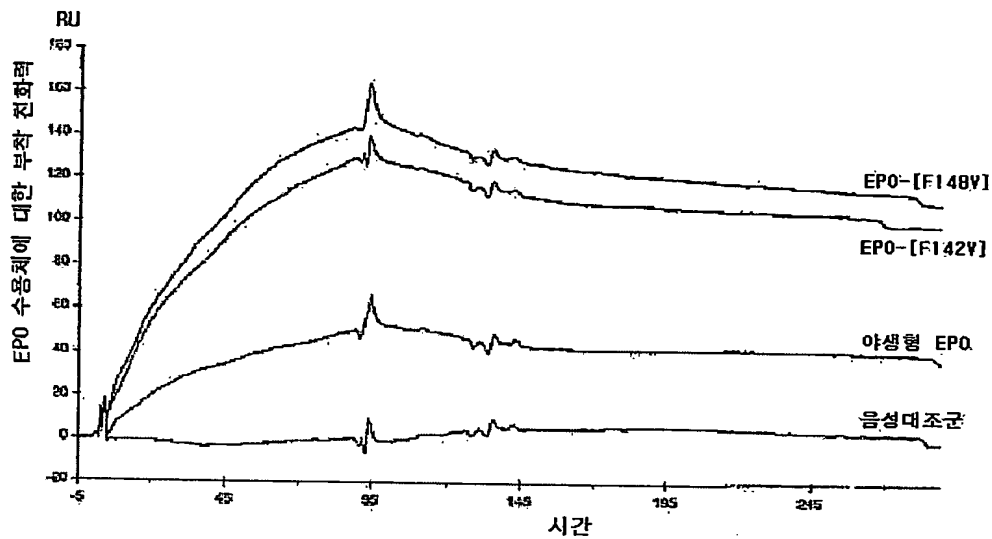
【도 4b】



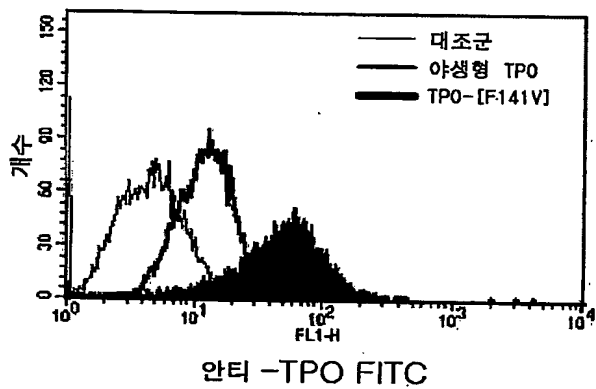
【도 5a】



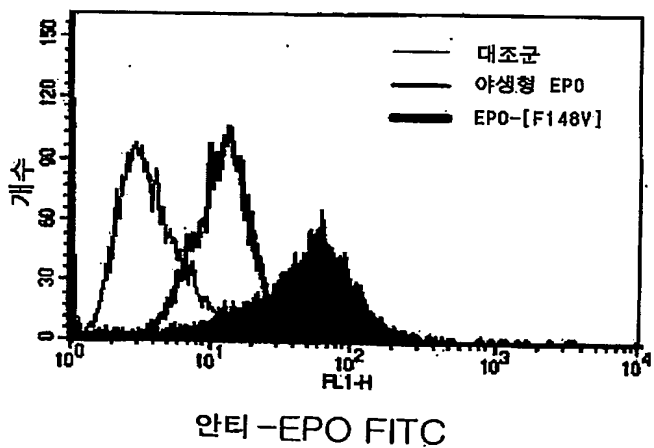
【도 5b】



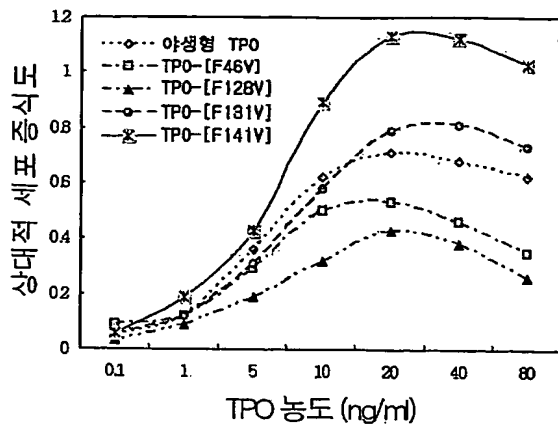
【도 6a】



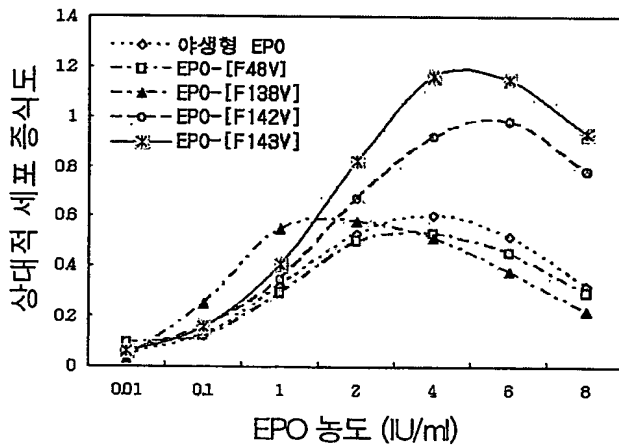
【도 6b】



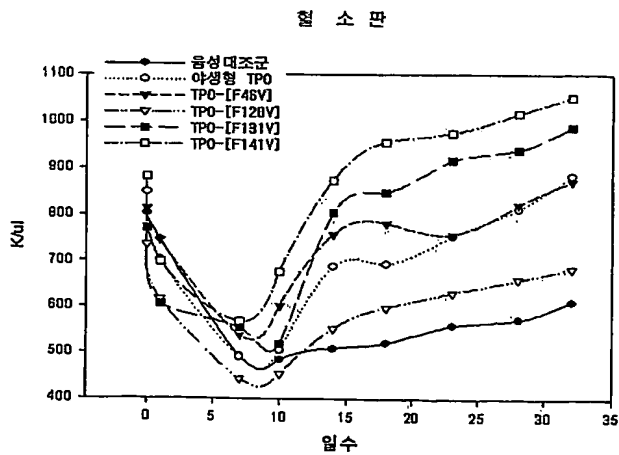
【도 7a】



【도 7b】

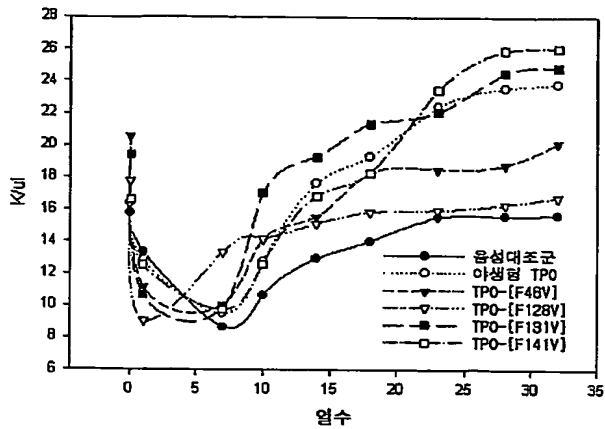


【도 8a】



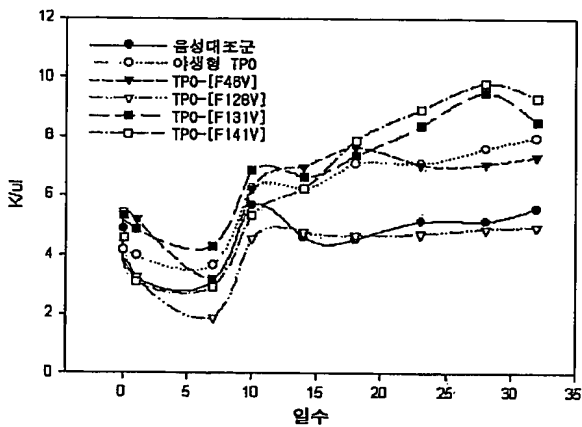
【도 8b】

백 혈 구



【도 8c】

중 성 구



## 【서열목록】

<110> MEDEXGEN <120> A method of improving efficacy of biological  
 response-modifying proteins and the example muteins <160> 42 <170>  
 KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 200 <212> PRT <213> Homo sapiens <400>  
 1 Met Ala Phe Thr Glu His Ser Pro Leu Thr Pro His Arg Arg Asp Leu 1 5  
 10 15 Cys Ser Arg Ser Ile Trp Leu Ala Arg Lys Ile Arg Ser Asp Leu

Thr 20 25 30 Ala Leu Thr Glu Ser Tyr  
 Val Lys His Gln Gly Leu Asn Lys Asn Ile 35 40  
 45 Asn Leu Asp Ser Ala Asp Gly Met Pro Val Ala Ser Thr Asp Gln Trp 50  
 55 60 Ser Glu Leu Thr Glu Ala Glu Arg Leu Gln Glu Asn Leu Gln Ala  
 Tyr 65 70 75 80 Arg Thr Phe His  
 Val Leu Leu Ala Arg Leu Leu Glu Asp Gln Gln Val 85  
 90 95 His Phe Thr Pro Thr Glu Gly Asp Phe His Gln Ala Ile His Thr  
 Leu 100 105 110 Leu Leu Gln Val Ala Ala  
 Phe Ala Tyr Gln Ile Glu Glu Leu Met Ile 115 120  
 125 Leu Leu Glu Tyr Lys Ile Pro Arg Asn Glu Ala Asp Gly Met Pro Ile 130  
 135 140 Asn Val Gly Asp Gly Gly Leu Phe Glu Lys Lys Leu Trp Gly Leu  
 Lys 145 150 155 160 Val Leu Gln Glu  
 Leu Ser Gln Trp Thr Val Arg Ser Ile His Asp Leu 165  
 170 175 Arg Phe Ile Ser Ser His Gln Thr Gly Ile Pro Ala Arg Gly Ser  
 His 180 185 190 Tyr Ile Ala Asn Asn Lys  
 Lys Met 195 200 <210> 2 <211> 166 <212> PRT <213>  
 Homo sapiens <400> 2 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr  
 Leu 1 5 10 15 Leu Glu Ala Lys Glu  
 Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His 20 25  
 30 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe 35  
 40 45 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val



Trp 50 55 60 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu  
 Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu 65 70 75  
 80 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp  
 85 90 95 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr  
 Thr Leu Leu Arg Ala Leu 100 105 110 Gly  
 Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala 115  
 120 125 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg  
 Val 130 135 140 Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys  
 Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala 145 150 155  
 160 Cys Arg Thr Gly Asp Arg 165 <210> 3 <211> 209 <212>  
 PRT <213> Homo sapiens <400> 3 Thr Gln Asp Cys Ser Phe Gln His Ser Pro Ile Ser  
 Ser Asp Phe Ala 1 5 10 15 Val Lys  
 Ile Arg Glu Leu Ser Asp Tyr Leu Leu Gln Asp Tyr Pro Val 20  
 25 30 Thr Val Ala Ser Asn Leu Gln Asp Glu Glu Leu Cys Gly Gly Leu  
 Trp 35 40 45 Arg Leu Val Leu Ala Gln Arg  
 Trp Met Glu Arg Leu Lys Thr Val Ala 50 55 60  
 Gly Ser Lys Met Gln Gly Leu Leu Glu Arg Val Asn Thr Glu Ile His 65  
 70 75 80 Phe Val Thr Lys Cys Ala Phe Gln Pro Pro  
 Pro Ser Cys Leu Arg Phe 85 90 95  
 Val Gln Thr Asn Ile Ser Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Glu Gln Leu 100  
 105 110 Val Ala Leu Lys Pro Trp Ile Thr Arg Gln Asn Phe Ser Arg Cys

Leu 115 120 125 Glu Leu Gln Cys Gln Pro Asp  
 Ser Ser Thr Leu Pro Pro Pro Trp Ser 130 135 140  
 Pro Arg Pro Leu Glu Ala Thr Ala Pro Thr Ala Pro Gln Pro Pro Leu 145  
 150 155 160 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Val Gly Leu  
 Leu Leu Leu Ala Ala Ala 165 170 175  
 Trp Cys Leu His Trp Gln Arg Thr Arg Arg Arg Thr Pro Arg Pro Gly 180  
 185 190 Glu Gln Val Pro Pro Val Pro Ser Pro Gln Asp Leu Leu Leu Val  
 Glu 195 200 205 His <210> 4 <211> 177  
 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 4 Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro  
 Gln Ser Phe Leu Leu Lys 1 5 10 15  
 Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln 20  
 25 30 Glu Lys Leu Val Ser Glu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro  
 Glu 35 40 45 Glu Leu Val Leu Leu Gly His  
 Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu 50 55 60  
 Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln 65  
 70 75 80 Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly  
 Leu Leu Gln Ala Leu Glu 85 90 95  
 Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp 100  
 105 110 Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu  
 Gly 115 120 125 Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro  
 Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala 130 135 140

Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu 145  
 150                      155                      160 Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val  
 Leu Arg His Leu Ala Gln                      165                      170                      175  
 Pro <210>    5 <211>    127 <212>    PRT <213>    Homo sapiens <400>    5 Ala Pro  
 Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val    1                      5  
 10                      15 Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp  
 Thr                      20                      25                      30 Ala Ala Glu Met Asn Glu  
 Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp                      35                      40  
 45 Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln                      50  
 55                      60 Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met  
 Met 65                      70                      75                      80 Ala Ser His Tyr  
 Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys                      85  
 90                      95 Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys  
 Asp                      100                      105                      110 Phe Leu Leu Val Ile Pro  
 Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu                      115                      120  
 125 <210>    6 <211>    191 <212>    PRT <213>    Homo sapiens <400>    6 Phe Pro  
 Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg    1                      5  
 10                      15 Ala Arg Arg Leu Tyr Gln Leu Ala Tyr Asp Thr Tyr Gln Glu Phe  
 Glu                      20                      25                      30 Glu Ala Tyr Ile Leu Lys  
 Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro                      35                      40  
 45 Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg                      50

55                                      60 Val Lys Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser  
 Leu 65                                      70                                      75                                      80 Leu Leu Ile Gln  
 Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Leu Leu Arg Ser Val                                      85  
 90                                      95 Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr  
 Arg                                      100                                      105                                      110 His Leu Lys Asp Leu Glu  
 Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Trp Arg Leu                                      115                                      120  
 125 Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Asn Gln Ser Tyr Ser                                      130  
 135                                      140 Lys Phe Asp Thr Lys Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn  
 Tyr 145                                      150                                      155                                      160 Gly Leu Leu Tyr  
 Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe                                      165  
 170                                      175 Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
 180                                      185                                      190 <210>                                      7 <211>                                      165 <212>                                      PRT <  
 213> Homo sapiens <400>                                      7 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg  
 Thr Leu Met                                      1                                      5                                      10                                      15 Leu Leu Ala  
 Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp                                      20  
 25                                      30 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe  
 Gln                                      35                                      40                                      45 Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val  
 Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe                                      50                                      55                                      60  
 Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu                                      65  
 70                                      75                                      80 Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln  
 Gln Leu Asn Asp Leu Glu                                      85                                      90                                      95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys 100  
 105 110 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr  
 Leu 115 120 125 Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr  
 Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg 130 135 140  
 Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser 145  
 150 155 160 Leu Arg Ser Lys Glu 165  
 <210> 8 <211> 166 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 8 Met Cys Asp  
 Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu 1 5  
 10 15 Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu  
 Lys 20 25 30 Asp Arg His Asp Phe Gly  
 Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe 35 40  
 45 Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile 50  
 55 60 Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu  
 Thr 65 70 75 80 Leu Leu Asp Lys  
 Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu 85  
 90 95 Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu  
 Met 100 105 110 Lys Glu Asp Ser Ile Leu  
 Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr 115 120  
 125 Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val 130  
 135 140 Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln  
 Glu 145 150 155 160 Ser Leu Arg Ser

Lys Glu 165 <210> 9 <211> 166 <212> PRT <213> Homo  
 sapiens <400> 9 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Cys Gln  
 1 5 10 15 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gl  
 Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu 20 25  
 30 Lys Asp Arg Arg Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln 35  
 40 45 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Val Thr Ile Tyr Glu Met Leu  
 Gln 50 55 60 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln  
 Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn 65 70 75  
 80 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Arg Asn  
 85 90 95 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu  
 Glu Lys Glu Asp Phe Thr 100 105 110 Arg  
 Gly Lys Arg Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg 115  
 120 125 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Asp Ser His Cys Ala Trp  
 Thr 130 135 140 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg  
 Asn Phe Tyr Val Ile Asn Arg Leu 145 150 155  
 160 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn 165 <210> 10 <211> 146 <212>  
 PRT <213> Homo sapiens <400> 10 Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu  
 Asn Leu Lys Lys 1 5 10 15 Tyr Phe  
 Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe 20  
 25 30 Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile  
 Met 35 40 45 Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe

```

Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys      50              55              60
Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met  65
70              75              80 Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys
Lys Arg Asp Asp Phe Glu              85              90              95
Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala              100
105              110 Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala
Lys              115              120              125 Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser
Gln Met Leu Phe Gln Gly Arg Arg Ala      130              135              140
Ser Gln 145      <210>      11 <211>      172 <212>      PRT <213>      Homo sapiens <400>
11 Cys Asp Leu Pro Gln Asn His Gly Leu Leu Ser Arg Asn Thr Leu Val      1
10              15 Leu Leu His Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Leu Cys Leu Lys
Asp              20              25              30 Arg Arg Asp Phe Arg Phe
Pro Gln Glu Met Val Lys Gly Ser Gln Leu              35              40
45 Gln Lys Ala His Val Met Ser Val Leu His Glu Met Leu Gln Gln Ile      50
55              60 Phe Ser Leu Phe His Thr Glu Arg Ser Ser Ala Ala Trp Asn Met
Thr  65              70              75              80 Leu Leu Asp Gln
Leu His Thr Gly Leu His Gln Gln Leu Gln His Leu              85
90              95 Glu Thr Cys Leu Leu Gln Val Val Gly Glu Gly Glu Ser Ala Gly
Ala              100              105              110 Ile Ser Ser Pro Ala Leu
Thr Leu Arg Arg Tyr Phe Gln Gly Ile Arg              115              120
125 Val Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Val Val      130

```

135                      140 Arg Met Glu Ile Met Lys Ser Leu Phe Leu Ser Thr Asn Met Gln  
 Glu 145                      150                      155                      160 Arg Leu Arg Ser  
 Lys Asp Arg Asp Leu Gly Ser Ser                      165                      170                      <210>  
 12 <211>      187 <212>      PRT <213>      Homo sapiens <400>      12 Leu Asp Leu Lys  
 Leu Ile Ile Phe Gln Gln Arg Gln Val Asn Gln Glu      1                      5  
 10                      15 Ser Leu Lys Leu Leu Asn Lys Leu Gln Thr Leu Ser Ile Gln Gln  
 Cys                      20                      25                      30 Leu Pro His Arg Lys Asn  
 Phe Leu Leu Pro Gln Lys Ser Leu Ser Pro                      35                      40  
 45 Gln Gln Tyr Gln Lys Gly His Thr Leu Ala Ile Leu His Glu Met Leu                      50  
 55                      60 Gln Gln Ile Phe Ser Leu Phe Arg Ala Asn Ile Ser Leu Asp Gly  
 Trp 65                      70                      75                      80 Glu Glu Asn His  
 Thr Glu Lys Phe Leu Ile Gln Leu His Gln Gln Leu                      85  
 90                      95 Glu Tyr Leu Glu Ala Leu Met Gly Leu Glu Ala Glu Lys Leu Ser  
 Gly                      100                      105                      110 Thr Leu Gly Ser Asp Asn  
 Leu Arg Leu Gln Val Lys Met Tyr Phe Arg                      115                      120  
 125 Arg Ile His Asp Tyr Leu Glu Asn Gln Asp Tyr Ser Thr Cys Ala Trp                      130  
 135                      140 Ala Ile Val Gln Val Glu Ile Ser Arg Cys Leu Phe Phe Val Phe  
 Ser 145                      150                      155                      160 Leu Thr Glu Lys  
 Leu Ser Lys Gln Gly Arg Pro Leu Asn Asp Met Lys                      165  
 170                      175 Gln Glu Leu Thr Thr Glu Phe Arg Ser Pro Arg                      180  
 185                      <210>      13 <211>      133 <212>      PRT <213>      Homo sapiens <400>      13



Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His 1 5  
 10 15 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr  
 Lys 20 25 30 Asn Pro Lys Leu Thr Arg  
 Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys 35 40  
 45 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys 50  
 55 60 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His  
 Leu 65 70 75 80 Arg Pro Arg Asp  
 Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu 85  
 90 95 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr  
 Ala 100 105 110 Thr Ile Val Glu Phe Leu  
 Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile 115 120  
 125 Ile Ser Thr Leu Thr 130 <210> 14 <211> 133 <212> PRT <  
 213> Homo sapiens <400> 14 Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Pro Leu Lys Thr Ser Trp  
 Val Asn Cys 1 5 10 15 Ser Asn Met  
 Ile Asp Glu Ile Ile Thr His Leu Lys Gln Pro Pro Leu 20  
 25 30 Pro Leu Leu Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly Glu Asp Gln Asp Ile  
 Leu 35 40 45 Met Glu Asn Asn Leu Arg Arg  
 Pro Asn Leu Glu Ala Phe Asn Arg Ala 50 55 60  
 Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu Ser Ile Leu Lys Asn 65  
 70 75 80 Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala  
 Ala Pro Thr Arg His Pro 85 90 95

Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe Arg Arg Lys Leu Thr 100  
 105 110 Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln Thr Thr  
 Leu 115 120 125 Ser Leu Ala Ile Phe 130  
 <210> 15 <211> 129 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 15 His Lys Cys  
 Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser 1 5  
 10 15 Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp  
 Ile 20 25 30 Phe Ala Ala Ser Lys Asn  
 Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala 35 40  
 45 Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg 50  
 55 60 Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu  
 Ile 65 70 75 80 Arg Phe Leu Lys  
 Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu 85  
 90 95 Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn  
 Phe 100 105 110 Leu Glu Arg Leu Lys Thr  
 Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser 115 120  
 125 Ser <210> 16 <211> 115 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 16 Ile  
 Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala 1 5  
 10 15 Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu  
 Arg 20 25 30 Ile Pro Val Pro Val His  
 Lys Asn His Gln Leu Cys Thr Glu Glu Ile 35 40  
 45 Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu Glu Ser Gln Thr Val Gln Gly Gly Thr 50

109-98

```

170              175 Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met              180
<210>   18 <211>   197 <212>   PRT <213>   Homo sapiens <400>   18 Arg Asn Leu
Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu   1              5
10              15 His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln
Lys              20              25              30 Ala Arg Gln Thr Leu Glu
Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp              35              40
45 His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu   50
55              60 Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu
Thr 65              70              75              80 Ser Phe Ile Thr
Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe              85
90              95 Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met
Tyr              100              105              110 Gln Val Glu Phe Lys Thr
Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys              115              120
125 Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu   130
135              140 Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser
Ser 145              150              155              160 Leu Glu Glu Pro
Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu              165
170              175 Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met
Ser              180              185              190 Tyr Leu Asn Ala Ser
195              <210>   19 <211>   146 <212>   PRT <213>   Homo sapiens <400>   19
Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr   1              5

```

109-100

Ser Ala Leu Ser Leu His 100 105 110 Ser  
 Lys Leu Asn Ala Thr Ala Asp Ile Leu Arg Gly Leu Leu Ser Asn 115  
 120 125 Val Leu Cys Arg Leu Cys Ser Lys Tyr His Val Gly His Val Asp  
 Val 130 135 140 Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Ser Gly  
 Lys Asp Val Phe Gln Lys Lys Lys 145 150 155  
 160 Leu Gly Cys Gln Leu Leu Gly Lys Tyr Lys Gln Ile Ile Ala Val Leu  
 165 170 175 Ala Gln Ala Phe 180 <210>  
 21 <211> 522 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 21 Glu Glu Val Ser Glu  
 Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu 1 5 10  
 15 Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln 20  
 25 30 Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val  
 Cys 35 40 45 Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu  
 Leu Val Gln Tyr Ile Met Glu Asp Thr 50 55 60  
 Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu 65  
 70 75 80 Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys  
 Phe Thr Lys Asp Tyr Glu 85 90 95  
 Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln 100  
 105 110 Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu  
 Leu 115 120 125 Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe  
 Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala 130 135 140  
 Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu 145

150                      155                      160 Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro  
 Ala Ser Val Ser Pro His                      165                      170                      175  
 Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu                      180  
 185                      190 Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln  
 Pro                      195                      200                      205 Leu His Thr Val Asp Pro Gly  
 Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser                      210                      215                      220  
 Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser 225  
 230                      235                      240 Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro  
 Ser Val Gly Ala Phe Asn                      245                      250                      255  
 Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val                      260  
 265                      270 Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln  
 Gly                      275                      280                      285 Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg  
 Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu                      290                      295                      300  
 Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala 305  
 310                      315                      320 Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val  
 Thr Gly Thr Ala Leu Pro                      325                      330                      335  
 Arg Val Gly Pro Val Arg Pro Thr Gly Gln Asp Trp Asn His Thr Pro                      340  
 345                      350 Gln Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu  
 Pro                      355                      360                      365 Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser  
 Leu Arg Pro Gln Gly Leu Ser Asn Pro                      370                      375                      380  
 Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly 385

390                      395                      400 Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly  
 Arg Arg Ser Thr Arg Asp                      405                      410                      415  
 Arg Arg Ser Pro Ala Glu Pro Glu Gly Gly Pro Ala Ser Glu Gly Ala                      420  
 425                      430 Ala Arg Pro Leu Pro Arg Phe Asn Ser Val Pro Leu Thr Asp Thr  
 Gly                      435                      440                      445 His Glu Arg Gln Ser Glu Gly  
 Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser                      450                      455                      460  
 Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val 465  
 470                      475                      480 Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg  
 Arg Ser His Gln Glu Pro                      485                      490                      495  
 Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr                      500  
 505                      510 Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val                      515  
 520                      <210>    22 <211>    227 <212>    PRT <213>    Homo sapiens <400>    22  
 Ala Ala Ile Gly Ser Cys Ser Lys Glu Tyr Arg Val Leu Leu Gly Gln    1                      5  
 10                      15 Leu Gln Lys Gln Thr Asp Leu Met Gln Asp Thr Ser Arg Leu Leu  
 Asp                      20                      25                      30 Pro Tyr Ile Arg Ile Gln  
 Gly Leu Asp Val Pro Lys Leu Arg Glu His                      35                      40  
 45 Cys Arg Glu Arg Pro Gly Ala Phe Pro Ser Glu Glu Thr Leu Arg Gly                      50  
 55                      60 Leu Gly Arg Arg Gly Phe Leu Gln Thr Leu Asn Ala Thr Leu Gly  
 Cys 65                      70                      75                      80 Val Leu His Arg  
 Leu Ala Asp Leu Glu Gln Arg Leu Pro Lys Ala Gln                      85  
 90                      95 Asp Leu Glu Arg Ser Gly Leu Asn Ile Glu Asp Leu Glu Lys Leu



Gln 100 105 110 Met Ala Arg Pro Asn Ile  
 Leu Gly Leu Arg Asn Asn Ile Tyr Cys Met 115 120  
 125 Ala Gln Leu Leu Asp Asn Ser Asp Thr Ala Glu Pro Thr Lys Ala Gly 130  
 135 140 Arg Gly Ala Ser Gln Pro Pro Thr Pro Thr Pro Ala Ser Asp Ala  
 Phe 145 150 155 160 Gln Arg Lys Leu  
 Glu Gly Cys Arg Phe Leu His Gly Tyr His Arg Phe 165  
 170 175 Met His Ser Val Gly Arg Val Phe Ser Lys Trp Gly Glu Ser Pro  
 Asn 180 185 190 Arg Ser Arg Arg His Ser  
 Pro His Gln Ala Leu Arg Lys Gly Val Arg 195 200  
 205 Arg Thr Arg Pro Ser Arg Lys Gly Lys Arg Leu Met Thr Arg Gly Gln 210  
 215 220 Leu Pro Arg 225 <210> 23 <211> 191 <212>  
 PRT <213> Homo sapiens <400> 23 Val Gln Thr Val Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp His  
 Ala Met Leu Gln 1 5 10 15 Ala His  
 Arg Ala His Gln Leu Ala Ile Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu 20  
 25 30 Glu Thr Tyr Ile Pro Lys Asp Gln Lys Tyr Ser Phe Leu His Asp  
 Ser 35 40 45 Gln Thr Ser Phe Cys Phe Ser  
 Asp Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Met 50 55 60  
 Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu 65  
 70 75 80 Leu Leu Ile Glu Ser Trp Leu Glu Pro Val  
 Arg Phe Leu Arg Ser Met 85 90 95  
 Phe Ala Asn Asn Leu Val Tyr Asp Thr Ser Asp Ser Asp Asp Tyr His 100

105                      110 Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg  
 Leu                      115                      120                      125 Glu Asp Gly Ser Arg Arg Thr  
 Gly Gln Ile Leu Lys Gln Thr Tyr Ser                      130                      135                      140  
 Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn His Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr 145  
 150                      155                      160 Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met  
 Asp Lys Val Glu Thr Phe                      165                      170                      175  
 Leu Arg Met Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe                      180  
 185                      190 <210>                      24 <211>                      248 <212>                      PRT <213>                      Homo sapiens  
 <400>                      24 Glu Gly Ile Cys Arg Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys Asp Val Thr                      1  
 5                      10                      15 Lys Leu Val Ala Asn Leu Pro Lys Asp Tyr Me  
 Ile Thr Leu Lys Tyr                      20                      25                      30 Val Pro  
 Gly Met Asp Val Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser Glu Met                      35  
 40                      45 Val Val Gln Leu Ser Asp Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys Phe  
 Ser                      50                      55                      60 Asn Ile Ser Glu Gly Leu Ser Asn  
 Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu Val                      65                      70                      75  
 80 Asn Ile Val Asp Asp Leu Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser Ser Lys  
 85                      90                      95 Asp Leu Lys Lys Ser Phe Lys Ser Pro Glu  
 Pro Arg Leu Phe Thr Pro                      100                      105                      110 Glu  
 Glu Phe Phe Arg Ile Phe Asn Arg Ser Ile Asp Ala Phe Lys Asp                      115  
 120                      125 Phe Val Val Ala Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val Ser Ser Thr  
 Leu                      130                      135                      140 Ser Pro Glu Lys Asp Ser Arg Val

Ser Val Thr Lys Pro Phe Met Leu 145 150 155  
 160 Pro Pro Val Ala Ala Ser Ser Leu Arg Asn Asp Ser Ser Ser Ser Asn  
 165 170 175 Arg Lys Ala Lys Asn Pro Pro Gly Asp Ser  
 Ser Leu His Trp Ala Ala 180 185 190 Met  
 Ala Leu Pro Ala Leu Phe Ser Leu Ile Ile Gly Phe Ala Phe Gly 195  
 200 205 Ala Leu Tyr Trp Lys Lys Arg Gln Pro Ser Leu Thr Arg Ala Val  
 Glu 210 215 220 Asn Ile Gln Ile Asn Glu Glu Asp  
 Asn Glu Ile Ser Met Leu Gln Glu 225 230 235  
 240 Lys Glu Arg Glu Phe Gln Glu Val 245 <210> 25  
 <211> 332 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 25 Ser Pro Ala Pro Pro Ala  
 Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu 1 5 10  
 15 Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val 20  
 25 30 His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser  
 Leu 35 40 45 Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met  
 Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu 50 55 60  
 Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln 65  
 70 75 80 Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu  
 Gly Gln Leu Ser Gly Gln 85 90 95  
 Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu 100  
 105 110 Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile  
 Phe 115 120 125 Leu Ser Phe Gln His Leu Leu

Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu 130 135 140  
 Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala 145  
 150 155 160 Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr  
 Leu Asn Glu Leu Pro Asn 165 170 175  
 Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr Ala Ser Ala Arg Thr 180  
 185 190 Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly Phe Arg Ala Lys  
 Ile 195 200 205 Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr  
 Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro Gly 210 215 220  
 Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly Thr Arg Gly Leu Phe 225  
 230 235 240 Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala  
 Pro Asp Ile Ser Ser Gly 245 250 255  
 Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu Gln Pro Gly Tyr Ser 260  
 265 270 Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Phe Pro  
 Leu 275 280 285 Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro  
 Val Val Gln Leu His Pro Leu Leu Pro 290 295 300  
 Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser Pro Leu Leu Asn Thr 305  
 310 315 320 Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln  
 Glu Gly 325 330 <210> 26 <211> 28 <212>  
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 26 cggaattccg  
 atggagctga ctgaattg 28 <210> 27 <211>  
 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 27

ttttagcggcc gcattcttac ccttcctgag 30 <210>  
 28 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400>  
 28 ccaagctaac gtccacagca g 21 <  
 210> 29 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
 primer <400> 29 gctcaggacg atggcat  
 17 <210> 30 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
 primer <400> 30 ggtgttggac gctcaggaag atg  
 23 <210> 31 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
 primer <400> 31 catcaggaca cgcacctttc c  
 21 <210> 32 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
 primer <400> 32 ggcgcgagaga tgggggt  
 17 <210> 33 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
 primer <400> 33 tggatcatctg tcccctgtcc tg  
 22 <210> 34 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
 primer <400> 34 gacattaact ttggtgtctg ggac  
 24 <210> 35 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
 primer <400> 35 ctgtccgcaa actcttccga g  
 21 <210> 36 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
 primer <400> 36 cgcaaactcg tccgagtcta ct  
 22 <210> 37 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
 primer <400> 37 gagtctactc caatgtggtg gg

22 <210> 38 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer <400> 38 cggaattcat ggaccacctc ggggcg

26 <210> 39 <211> 32 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer <400> 39 gctctagact aagagcaagc cacatagctg gg

32 <210> 40 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer <400> 40 cccaagctta tggagctgac tgaattgctc ctc

33 <210> 41 <211> 32 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer <400> 41 ggaattctta cccttcctga gacagattct gg

32 <210> 42 <211> 34 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer <400> 42 gctctagagc tcatttaccc ggagacaggg agag

34

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**